



Etude de la toxicité in vitro et de l'efficacité ex vivo et in vivo de formes galéniques de calixarène développées pour le traitement des contaminations cutanées dues à des composés d'uranium

Sophie Grives

► To cite this version:

Sophie Grives. Etude de la toxicité in vitro et de l'efficacité ex vivo et in vivo de formes galéniques de calixarène développées pour le traitement des contaminations cutanées dues à des composés d'uranium. Pharmacie galénique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA114815 . tel-01170070

HAL Id: tel-01170070

<https://theses.hal.science/tel-01170070>

Submitted on 1 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2014 - 2015

SÉRIE DOCTORAT N° 1325

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 13 mars 2015

par

Sophie GRIVÈS

Etude de la toxicité *in vitro* et de l'efficacité *ex vivo* et *in vivo* de formes galéniques de calixarène développées pour le traitement des contaminations cutanées dues à des composés d'uranium

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Pr. Elias FATTAL	UMR CNRS 8612, Institut Galien Paris-Sud, Châtenay-Malabry
Rapporteurs :	Dr. Rebecca ABERGEL	Lawrence Berkeley National Laboratory, USA
	Pr. Marie-Alexandrine BOLZINGER	Université de Lyon, LAGEP
Examineurs :	Pr. Odile CHAMBIN	Université de Bourgogne, UFR Pharmacie, Dijon
	Dr. Bernard LE GUEN	EDF - DPI, Saint-Denis
	Dr. Guillaume PHAN	IRSN, Fontenay-aux-Roses
	Dr. Haude TYMEN	DGA - DS - SASF, Bagneux



Ce travail de thèse a été réalisé conjointement dans deux laboratoires de recherche :

Unité Mixte de Recherche, Centre National de Recherche Scientifique (UMR CNRS) 8612,

Institut Galien Paris-Sud,

5 rue Jean-Baptiste Clément

92290 Châtenay-Malabry

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN),

Radioprotection et Protection de l'Homme (PRP-HOM),

Service de Dosimétrie Interne (SDI),

Laboratoire de RadioChimie (LRC),

31 avenue de la Division Leclerc,

92260 Fontenay-aux-Roses

Grâce à un co-financement de l'IRSN et de la Direction Générale de l'Armement (DGA)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Professeur Elias Fattal, directeur de l'UMR 8612 du CNRS, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe des « fragiles », mais également pour son encadrement en tant que directeur de thèse et la confiance dont il a fait preuve à mon égard durant ces 3 années.

J'adresse également mes sincères remerciements au Professeur Marie-Alexandrine Bolzinger ainsi qu'au Docteur Rebecca Abergel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse, ainsi qu'au Professeur Odile Chamblin, et aux Docteurs Haude Tymen et Bernard Le Guen de m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également Madame Aurélie Gauci d'avoir accepté d'être ma tutrice de la Direction Générale de l'Armement (DGA), et Madame Emmanuelle Guillot-Combe pour leur suivi et leurs encouragements.

Je remercie le Docteur Jocelyne Aigueperse, Directeur de la Direction de la RadioProtection de l'Homme de l'IRSN (PRP-HOM), pour son accueil au sein de cette direction.

Je tiens à remercier également le Docteur Michelle Agarande, Chef du service de la Dosimétrie Interne (SDI), ainsi que son adjointe, le Docteur Valérie Renaud-Salis, et le Docteur François Rebière, Chef du Laboratoire de RadioChimie (LRC), pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'Institut dans les meilleures conditions. Merci également pour leur intérêt envers ce sujet de thèse, et les discussions scientifiques que cela a engendré.

Côté LRC...et LEDI

Un grand merci au Docteur Guillaume Phan pour son encadrement tout au long de cette thèse, ses conseils et son optimisme. Je le remercie également pour son implication quant aux nombreuses expérimentations *in vivo* à Pierrelatte !

J'adresse également mes remerciements à Monsieur David Suhard pour son aide, notamment lors des études *in vivo*, ainsi que pour le temps qu'il a su me consacrer lors de multiples discussions scientifiques ou encore pour l'apprentissage de la mise en résine et de coupes histologiques d'échantillons biologiques. Merci également pour sa bonne humeur, même lorsqu'une longue journée d'euthanasie nous attendait...

Un immense merci au Docteur Céline Bouvier-Capely pour sa gentillesse, son écoute, son soutien et son calme sans faille. Merci pour ta patience, grâce à toi la dilution isotopique n'aura maintenant (presque) plus de secret pour moi, tout comme les smileys pour toi ! Je suis certaine que mes taquineries te manqueront... ;)

Je tiens également à remercier Madame Annabelle Manoury pour son aide quant aux minéralisations des échantillons biologiques, et pour ses astuces de chimistes (ou comment faire fondre du verre...). Merci pour ta joie de vivre communicative !

Merci au Docteur Christine Tessier pour les analyses SIMS réalisées et le temps consacré à mon sujet de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Alexandre Legrand pour sa formation sur l'ICP-MS. Un petit clin d'œil aux nombreux débats que tu affectionnes, et à ton « calme » légendaire face aux machines qui te font de la résistance, m'empêchant de sortir de mon bureau (à défaut de brandir un drapeau blanc ?) !...

Un grand merci également à Madame Géraldine Landon pour son soutien, ses nombreux petits conseils astucieux et ses goûts télévisés permettant de nombreux debriefing ! Merci également pour ta bonne humeur !

Je remercie tout particulièrement Mme Floriane Carpentier pour son écoute, sa gentillesse sans limite et son soutien inconditionnel en cette fin de thèse... Merci également pour ta relecture et pour la mise en place de la boîte à bonbons en cas de coups durs !

Je tiens à remercier également Mme Sarah Baghdadi, ma « co-bureau » et « co-thésarde » pour ces 3 années passés ensemble. Je te remercie pour tous ces moments partagés, mais également pour les calculs de spéciations et le partage de « ton » ICP ! Courage pour cette dernière ligne droite, plus que quelques mois avant la ligne d'arrivée !

Merci à Juliette Ambroise, secrétaire du SDI, pour son organisation, ainsi que pour la gestion des dossiers administratifs et des commandes, même lorsqu'elles étaient de dernières minutes.

Merci bien évidemment à tous les stagiaires pour la bonne humeur qu'ils ont apportée au sein du laboratoire ! Merci à Aurélie Sylvain, arrivée pendant mon début de thèse, pour son enthousiasme et sa joie de vivre, j'espère que tu te souviens encore de mes cours de Rubik's Cube ! Merci également à Maïlie Saint Hilaire pour sa gentillesse, à Clément Beyaert pour sa dispersion de cœurs (!) et à Aymeric Péroux pour son humour, son bracelet Bannette et son éloge sans fin de « Métro » ! Merci à Guillaume Morat pour son aide et son implication dans mon sujet de thèse quant aux expérimentations *ex vivo*. Et enfin, merci à Binta Mané pour sa sympathie et ses prises de notes lors des différentes répétitions !

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du Laboratoire de Dosimétrie Interne (LEDI) ainsi que leurs ex-doctorantes Alexandra et Alice pour leur sympathie à mon égard et les nombreuses discussions aux détours d'un couloir.

Côté LRTox...

Un grand merci au Docteur Jean-Marc Bertho pour son aide tant scientifique qu'organisationnelle, ainsi que pour ses conseils.

Merci également à toutes les personnes ayant contribué au bon déroulement des expérimentations *in vivo* à Pierrelatte : Olivia Delissen, Frédéric Voyer, Jean-Michel Guichet et Thierry Loiseau. Merci également pour toute votre sympathie à mon égard !

Je tiens bien évidemment à remercier Christelle Elie pour sa constante bonne humeur communicative et ses encouragements !

Merci également à l'ensemble de l'équipe du LRTox pour votre soutien et votre sympathie !

Côté CNRS...

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Nicolas Tsapis, le Docteur Hervé Hillaireau et Madame Stéphanie Denis pour leur gentillesse, leur écoute et leur aide scientifique. Merci également pour vos encouragements !

Un immense merci à Julie Mougin pour m'avoir supporté et écouté pendant ces 3 années ! Merci pour ton soutien, ton amitié, pour m'avoir suivi dans des vacances improvisées à Djerba et avoir acceptée d'être ma témoin...

J'adresse également mes remerciements à l'ensemble des personnes de l'UMR 8612 du CNRS pour leurs encouragements tout au long de ces années.

Côté perso...

Mes remerciements vont tout naturellement vers mes parents pour leur soutien tout au long de ce « stage » et leur écoute.

Un immense merci également à ma sœur pour ses conseils et sa relecture avisée !

Je remercie chaleureusement tous mes amis du « nord » ou d'ailleurs qui m'ont accompagnée durant ces 3 ans de thèse, sans toujours comprendre quand ma thèse se terminerait... Merci pour tous les bons moments passés ensemble !

Et enfin, je ne peux terminer ce chapitre sans remercier du plus profond de mon cœur Adrien, pour toute l'attention, la patience, le soutien et l'écoute dont il a su faire preuve. Merci d'être présent à mes côtés au quotidien et de m'avoir supporté durant les moments difficiles de la thèse.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES TABLEAUX	15
AVANT-PROPOS	16
CHAPITRE I - ETAT DE L'ART	19
1. L'uranium.....	20
1.1. Origine	20
1.2. Propriétés physico-chimiques	21
1.3. Propriétés radiologiques	22
1.4. Métrologie	24
1.5. Exploitation dans l'industrie nucléaire.....	25
2. Les risques d'exposition à l'uranium dans l'industrie nucléaire et leurs impacts	27
2.1. Les différents types d'exposition	27
2.2. Biocinétique de l'uranium	28
2.3. Toxicité de l'uranium	30
2.4. Traitements actuels des contaminations	32
3. La contamination cutanée par l'uranium	33
3.1. La peau humaine.....	34
3.1.1. Anatomie et physiologie.....	34
3.1.2. Absorption et cinétique de diffusion percutanée	38
3.2. Modèles d'étude de la diffusion transdermique	41
3.2.1. Modèles ex vivo.....	42
3.2.2. Modèles in vitro.....	45
3.2.3. Modèles in vivo.....	46
3.3. Contamination cutanée par l'uranium.....	47
3.3.1. Peau intacte	48
3.3.2. Peau présentant des lésions superficielles	54

3.3.3.	<i>Peau présentant des blessures profondes</i>	59
3.4.	Traitements d'urgence spécifique de la contamination cutanée par l'uranium.....	63
3.4.1.	<i>Traitements actuels</i>	63
3.4.2.	<i>Traitements à l'étude</i>	66
4.	Nanoémulsion de calix[6]arène : une nouvelle approche pour un traitement d'urgence	75
4.1.	Les calixarènes : définition et structure	75
4.2.	Applications des calixarènes	75
4.3.	Le 1,3,5-OCH ₃ -2,4,6-OCH ₂ COOH- <i>p</i> -tertbutylcalix[6]arène	76
4.4.	Formulation intégrant le calix[6]arène	78
4.5.	Caractérisation de la nanoémulsion de calix[6]arène.....	79
4.5.1.	<i>Physico-chimie</i>	79
4.5.2.	<i>Efficacité in vitro</i>	80
4.5.3.	<i>Optimisation de l'efficacité d'extraction in vitro</i>	82
4.5.4.	<i>Efficacité ex vivo</i>	84
4.5.5.	<i>Formulations dérivées</i>	85
	REFERENCES – CHAPITRE I	87
	CHAPITRE II – TRAVAUX EXPERIMENTAUX	98
	Partie 1 : Evaluation ex vivo du potentiel de la nanoémulsion de 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertbutylcalix[6]arène pour la décontamination cutanée d'explants de peaux lésés superficiellement et contaminés par une solution chargée en uranium & Evaluation in vitro de sa toxicité cutanée	95
	Publication 1: Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion	97
	Abstract	98
1.	Introduction	103
2.	Materials and methods	103
2.1.	Chemicals.....	104
2.2.	Preparation and characterization of calixarene-loaded nanoemulsion.....	104
2.3.	Ex vivo uranium decontamination efficiency.....	105
2.4.	Simulations of superficial wounds	105

2.5.	Thickness and Transepidermal Water Loss of skin pieces	106
2.6.	Sample analysis	106
2.7.	Assessment of in vitro skin toxicity of calixarene-loaded nanoemulsion	107
2.7.1.	<i>Tissues, culture conditions and treatments of skin units</i>	107
2.7.2.	<i>Irritation measurement by MTT test</i>	108
2.7.3.	<i>Measurement of IL-1- α release</i>	108
2.7.4.	<i>Measurement of LDH release</i>	108
2.8.	Statistical analysis	109
3.	Results	109
3.1.	Superficial wounds.....	109
3.2.	<i>Ex vivo</i> decontamination efficiency	110
3.3.	<i>In vitro</i> toxicity of calixarene-loaded nanoemulsion.....	114
3.4.	MTT	114
3.5.	IL-1- α	115
3.6.	LDH activity	115
4.	Discussion	116
5.	Conclusion	118
6.	Acknowledgments	118
	References	115

Partie 2 : Evaluation <i>in vivo</i> du potentiel de la nanoémulsion de 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertbutylcalix[6]arène pour le traitement de peaux présentant des lésions superficielles et contaminées par une solution chargée en uranium	118
---	------------

Publication 2: Compared <i>in vivo</i> efficiency of calixarene nanoemulsion and soaped water in the treatment of superficial wounds contaminated by uranium	120
---	------------

Abstract	121
1. Introduction	126
2. Materials and methods	127
2.1. Chemicals.....	127
2.2. Preparation and characterization of calixarene-loaded nanoemulsion.....	128

2.3.	<i>In vivo</i> studies	128
2.3.1.	<i>Animals</i>	128
2.3.2.	<i>Wounded skin contamination procedure</i>	129
2.3.3.	<i>Sample collection</i>	129
2.3.4.	<i>Sample analysis by ICP-MS</i>	130
2.3.5.	<i>Localization of uranium in skin biopsies by SIMS microscopy</i>	130
2.4.	Statistical analysis	130
3.	Results	130
3.1.	Uranium quantity in rat tissues	130
3.1.1.	<i>After contamination on skin wounded by superficial stings</i>	131
3.1.2.	<i>After contamination on excoriated skin</i>	132
3.2.	Localization of uranium in skin	133
4.	Discussion	134
5.	Conclusion	136
6.	Acknowledgments	136
	References	133
	Discussion générale	136
1.	Pertinence des modèles d'études et conditions expérimentales	142
1.1.	Etudes de l'efficacité de décontamination <i>ex vivo</i>	142
1.2.	Etudes de l'efficacité de décontamination <i>in vivo</i>	146
1.3.	Etudes de la toxicité <i>in vitro</i> de la nanoémulsion de calixarène.....	153
2.	Intérêt de la nanoémulsion de calixarène	155
	Conclusion & Perspectives	152
	REFERENCES - DISCUSSION GENERALE	155
	ANNEXES	158

LISTE DES ABREVIATIONS

AIEA : Agence Internationale de l'Energie Atomique

AMBP : Acide aminométhane biphosphonique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ASN : Autorité de Sureté Nucléaire

Ca²⁺ : Ions calciques

CAPBP : Acide carballyl amido bisphosphonique

CBMIDA : Acide catéchol-3,6-bis-méthyleiminodiacétique

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique (= ICRP)

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Milieu de culture)

DTPA : Acide diéthylène triamine pentaacétique

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EHBP : Ethane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (= EHDP)

EHDP : Ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (= EHBP)

H/E : Huile dans Eau

HF : Acide fluorhydrique

HLB : Balance Hydrophile-Lipophile (Hydrophilic Lipophilic Balance)

HNO₃ : Acide nitrique

HPMC : Hydroxypropylméthyl cellulose

ICP-MS : Spectrométrie de Masse par Plasma à Couplage Inductif (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

ICRP : International Commission on Radiological Protection (= CIPR)

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire

KPA : Analyse cinétique de la Phosphorescence (Kinetic Phosphorescence Analysis)

LRC : Laboratoire de RadioChimie

LSEs : Modèles équivalents de peaux vivantes (Living Skin Equivalent models)

m/z : Rapport masse sur charge

MC : Méthyl cellulose

MOX : Mélange d'oxyde d'uranium et d'oxyde de plutonium (Mixed Oxyde fuel)

MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

NaOH : Hydroxyde de sodium

NCRP : Conseil National sur la Protection Radiologique et les mesures (National Council on Radiation Protection and measurements)

OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques (= OECD)

OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development (= OCDE)

PBS : Phosphate Buffered Saline

PIE : Perte Insensible en Eau (= TEWL)

RHE : Epiderme humain reconstitué (Reconstructed Human Epidermis)

SDS : Sodium DodecylSulfate

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

TEWL : Transepidermal Water Loss (= PIE)

U : Uranium

U_a : Uranium appauvri

UF_4 : Tétrafluorure d'uranium

UF_6 : Hexafluorure d'uranium

UMR : Unité Mixte de Recherche

UO_2 : Dioxyde d'uranium

UO_2^{2+} : Ion uranyle

UO_3 : Trioxyde d'uranium

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

Figure 1 : Spéciation de l'ion uranyle en tampon acétate dans les conditions expérimentales <i>ex vivo</i> (logiciel MEDUSA)	22
Figure 2 : La radioactivité, désintégration d'un noyau instable	22
Figure 3 : Chaîne de décroissance de ^{235}U et ^{238}U	23
Figure 4 : Schéma de fonctionnement de l'ICP-MS	25
Figure 5 : Schéma de la réaction en chaîne de la fission nucléaire	26
Figure 6 : Cycle du combustible nucléaire en France	26
Figure 7 : Recensement de la fréquence des différentes voies de contamination entre 1970 et 2003 dans les centres CEA-AREVA	28
Figure 8 : Répartition moyenne de l'uranium après incorporation dans le corps humain, 24 h après contamination	29
Figure 9 : Schéma fonctionnel du rein.....	30
Figure 10 : Schéma de la structure de la peau	34
Figure 11 : Structures de l'épiderme	35
Figure 12 : Schéma des principales voies de passage transcutané	39
Figure 13 : Molécules d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) et d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)	63
Figure 14 : Représentation schématique d'une micelle et d'un liposome	67
Figure 15 : Molécule de 3,4,3-LI(1,2-HOPO).....	69
Figure 16 : Molécule d'acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP)	70
Figure 17 : Molécule de pamidronate	71
Figure 18 : Molécule d'acide catéchol-3,6-bis-méthyliminodiacétique (CBMIDA)	72

Figure 19 : Structure de base des calix[n]arènes	75
Figure 20 : Structure d'un calix[6]arène	75
Figure 21 : Structure du 1,3,5-OCH ₃ -2,4,6-OCH ₂ COOH- <i>p</i> -tertbutylcalix[6]arène.....	77
Figure 22 : Représentation schématique de la nanoémulsion de calixarène	78
Figure 23 : Illustration schématique de la localisation du calixarène dans la nanoémulsion	80

CHAPITRE II - DISCUSSION

Figure 24 : Diagramme de spéciation de l'ion uranyle en tampon acétate dans les conditions expérimentales <i>ex vivo</i> (logiciel MEDUSA)	145
Figure 25 : Cinétique de diffusion percutanée de l'uranium en cellules de Franz, en fonction de l'intégrité des explants de peau, après contamination par 600 µL de nitrate d'uranyle à 10 mg.L ⁻¹ , <i>n</i> = 6.....	145
Figure 26 : Effet de la variation de la concentration de l'ion uranyle sur sa spéciation en milieu tampon acétate dans les conditions expérimentales <i>in vivo</i> , avec (a) [U(VI)] = 5,6.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹ ; (b) [U(VI)] = 5,6.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ ; (c) [U(VI)] = 1,12.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ et (d) [U(VI)] = 2,24.10 ⁻³ mol.L ⁻¹ (logiciel MEDUSA).....	149
Figure 27: Effet de la variation de la concentration en carbonate sur la spéciation de l'ion uranyle en milieu tampon acétate dans les conditions expérimentales <i>in vivo</i> concentrée 10 fois avec [U(VI)] = 5,6.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ et (a) [CO ₃ ²⁻] = 0 mol.L ⁻¹ ; (b) [CO ₃ ²⁻] = 0,01 mol.L ⁻¹ et (c) [CO ₃ ²⁻] = 0,1 mol.L ⁻¹ (logiciel MEDUSA)	150
Figure 27 : Quantité d'uranium (ng) détectée dans les différents échantillons prélevés, en fonction du traitement appliqué immédiatement après contamination cutanée par du nitrate d'uranyle de rats présentant des micro-coupures.	151
Figure 28 : Couches supérieures d'une peau de rat contaminé par du nitrate d'uranyle, traité immédiatement par de l'eau ultrapure; (a) : Images histologiques; (b) superposition des images SIMS ²³⁸ U ⁺ (rouge) et ⁴⁰ Ca ⁺ (vert); (c) spectre de masse entourant la masse 238 de l'uranium	153
Figure 29 : Viabilité d'une lignée cellulaire de NIH3T3 en fonction de la quantité de nanoémulsions mises en contact.....	154

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I

Tableau 1 : Concentration en uranium (mg.kg^{-1}) des principaux milieux naturels dans l'environnement.....	20
Tableau 2 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium.....	24
Tableau 3 : Epaisseur de la peau, de l'épiderme et de la couche cornée en fonction de l'espèce considérée.....	44
Tableau 4 : Etat de la peau en fonction de la perte insensible en eau	45
Tableau 5 : Absorption cutanée de l'uranium au travers de peaux intactes	53
Tableau 6 : Diffusion de l'uranium après contamination sur d'une peau blessée superficiellement.....	58
Tableau 7 : Diffusion de l'uranium après contamination sur blessure profonde.....	62
Tableau 8 : Recommandations des agences internationales et des autorités nucléaires, pour la décontamination radiologique de la peau	65
Tableau 9 : Traitements étudiés pour la décontamination et/ou la décorporation de l'uranium par des agents chélatants.....	74

Avant-propos

La contamination cutanée par l'uranium, métal lourd radioactif, est l'un des principaux modes de contamination, avec l'inhalation, des travailleurs de l'industrie nucléaire. Cela constitue une voie d'entrée préoccupante du radionucléide dans l'organisme par le biais de la circulation sanguine. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que la diffusion transcutanée du radioélément est d'autant plus importante que la peau présente des lésions au niveau de la couche cornée, augmentant ainsi sa biodisponibilité. Ainsi, une contamination initialement externe va induire une exposition interne de la victime à l'uranium, qui va en partie être directement éliminé par voie urinaire, mais également stocké au niveau rénal et osseux. Cette rétention de l'uranium dans les organes cibles peut alors provoquer des toxicités à la fois chimiques et radiologiques.

A l'heure actuelle, le seul traitement disponible dans ce cas de figure consiste en un rinçage immédiat de la zone cutanée contaminée par de l'eau tiède éventuellement additionnée de savon. Une fois la victime transférée au service médical, des décorporants pourront lui être administrés par injection intraveineuse afin de favoriser l'excrétion de l'uranium par voie urinaire. Toutefois, les décorporants disponibles ne semblent pas être efficaces pour la chélation spécifique de l'uranium, et paraissent même potentialiser les effets néphrotoxiques de ce radioélément. Aucun traitement n'est par ailleurs disponible pour limiter l'entrée de l'uranium dans l'organisme.

C'est pourquoi plusieurs travaux ayant pour objectif d'améliorer la prise en charge des victimes ont été menés. Dans ce contexte, de nouveaux agents décorporants plus affins et sélectifs vis-à-vis de l'uranium ainsi que de nouveaux traitements cutanés ont été étudiés, mais aucun n'a encore à ce jour abouti à un système efficace permettant la décontamination cutanée de l'uranium.

Dans ce contexte, un programme de recherche, en collaboration entre le Laboratoire de RadioChimie (LRC) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) et l'UMR CNRS 8612 (Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique), a été initié en 2006 dans le but de développer de nouvelles formes pharmaceutiques incorporant un agent chélatant de la famille des calixarènes, afin de traiter spécifiquement les contaminations cutanées dues à des composés d'uranium. C'est ainsi qu'a été développée une nanoémulsion huile dans eau (H/E) incorporant des molécules de calix[6]arène, dont les premières études d'efficacité de décontamination ont été probantes.

Les études actuelles, présentées dans la partie expérimentale de ce manuscrit, visent à évaluer l'efficacité de décontamination de cette nanoémulsion de calixarène après contamination de peaux excoriées, ou de peaux présentant des lésions superficielles telles que des coupures ou des piqûres. L'étude de cette efficacité est menée à la fois sur des modèles *ex vivo*, par l'utilisation d'explants de peau d'oreille de porc, et *in vivo* chez le rat. Afin de vérifier l'innocuité cutanée de cette formulation novatrice dans le traitement

de contamination externe, sa toxicité locale *in vitro* a également été évaluée par le biais de l'utilisation d'épiderme humain reconstitué (RHE).

Ainsi ce manuscrit de thèse se composera selon les parties suivantes :

- Une partie introductive bibliographique, qui présentera tout d'abord l'élément uranium, les risques d'exposition à celui-ci dans l'industrie nucléaire et leurs impacts. Une attention particulière sera ensuite portée sur le cas particulier de la contamination cutanée par l'uranium. Les traitements d'urgence de décontamination mis en place et ceux actuellement à l'étude seront alors abordés, et un accent sera mis sur les études menées sur la nanoémulsion de calixarène.
- Une partie sur les travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse sera ensuite exposée. Celle-ci s'axera tout d'abord sur les études d'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène menées *ex vivo* sur des peaux présentant divers modèles de lésions superficielles, ainsi que sur l'étude de sa toxicité cutanée *in vitro*. Un deuxième volet sera ensuite consacré à l'étude de son efficacité *in vivo* chez le rat.

Finalement, après discussion de ces travaux, une conclusion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sera présentée, et les perspectives de ces études seront exposées.

Chapitre I - Etat de l'art

1. L'uranium

1.1. Origine

L'uranium fut mis en évidence en 1789 par le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth, et ensuite isolé et nommé en 1841 par Eugène-Melchior Péligot, chimiste français. La radioactivité de cet élément naturel a été découverte bien plus tard, en 1896, par le physicien français Henri Becquerel. L'uranium attira tout d'abord la curiosité par sa coloration et la fluorescence de ses composés, et fut dans un premier temps principalement utilisé comme pigment coloré dans la faïence et la céramique.

La découverte de la fission de l'uranium se fit seulement dans les années 1930-1940 par l'équipe d'Enrico Fermi, physicien italo-américain, fait marquant l'avènement de l'énergie nucléaire. Cette fission fut tout d'abord utilisée à des fins militaires, avec la fabrication de la bombe atomique constituée de ^{235}U qui détruisit la ville d'Hiroshima (Japon) en 1945, puis ensuite civiles, par la production d'énergie électrique. Après la seconde guerre mondiale, l'utilisation à des fins civiles s'est largement répandue, notamment en France, entraînant une expansion rapide des centrales nucléaires (Adloff & Genet 2001).

L'uranium est naturellement présent dans l'environnement en quantité variable dans les roches, l'eau, l'air, les sols et les êtres vivants (Bonin & Blanc 2001). Il est notamment retrouvé dans les sols européens à raison d'environ 2 mg.kg^{-1} (Garnier-Laplace *et al.* 2001), et la teneur moyenne dans le corps humain est de $90 \mu\text{g}$ (Ansoborlo *et al.* 2002). A titre d'exemples, le [tableau 1](#) présente les concentrations en uranium naturel rencontrées dans diverses matrices environnementales.

Tableau 1 : Concentration en uranium (mg.kg^{-1}) des principaux milieux naturels dans l'environnement (Ansoborlo *et al.* 2002)

Milieu	Concentration en uranium (mg.kg^{-1})
Air	$5.10^{-8} (\text{mg.m}^{-3})$
Alimentation (apport quotidien)	1.10^{-6} à 3.10^{-6}
Eaux minérales (France)	1.10^{-6} à 8.10^{-5}
Eau de mer	3.10^{-3}
Roche basaltique	0,5
Sol calcaire	1
Ecorce terrestre	2
Roche granitique	5
Gisement uranifère	10 000

1.2. Propriétés physico-chimiques

De symbole U, l'uranium fait partie de la famille des actinides. Métal lourd radioactif d'une masse volumique de $19,1 \text{ g.cm}^{-3}$, il est composé de 92 protons et de 135 à 148 neutrons. L'uranium peut se présenter sous quatre valences différentes : III (U^{3+}), IV (U^{4+}), V (UO_2^+) et VI (UO_2^{2+}), avec un degré d'oxydation zéro pour l'uranium métallique. Les états d'oxydation les plus stables correspondent aux valences IV et VI, formes les plus répandues dans les minerais. L'uranium forme alors des complexes avec d'autres éléments, dont notamment l'oxygène, l'azote ou le soufre. Certains composés, présents notamment dans les sols tels que le fer, l'aluminium, les ions carbonates, les ions phosphates, les ions sulfates, ou encore le silicium, ont une forte affinité de complexation avec l'ion uranyle. Ces liaisons sont favorisées en conditions oxydantes, où l'uranium sera plus facilement soluble (Madic & Genet 2001).

Le travail expérimental qui suit porte sur le traitement de contaminations cutanées par l'uranium, qui sont réalisées à l'aide de solutions de nitrate d'uranyle. Il s'agit de la forme la plus diffusible de l'uranium, dont les effets sont les plus défavorables pour l'organisme.

Aussi le paragraphe suivant a pour objectif de résumer les principales propriétés de l'uranium en phase aqueuse, afin de mieux appréhender son comportement par la suite.

En solution aqueuse, l'uranium peut exister sous ses quatre valences, mais il se présente préférentiellement en valence VI en milieu acide, sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} . En effet, U(III) va être oxydé par les molécules d'eau et les protons, U(IV) a une faible solubilité, et enfin l'uranium au degré d'oxydation V est thermodynamiquement instable. L'hydrolyse des ions uranium se manifeste lors de l'accroissement du pH d'une solution acide d'uranium, et varie selon l'ion considéré. C'est ainsi que l'hydrolyse de $\text{U(IV)}_{(\text{aq})}$ se produit pour des valeurs très basses de pH, alors que celle de $\text{U(VI)}_{(\text{aq})}$ apparaît pour des valeurs de pH plus élevées. Dans les deux cas, les valeurs de pH seront d'autant plus basses que la concentration d'ions uranium en solution sera élevée. La stabilité du complexe est ainsi dépendante du pH, mais également du potentiel d'oxydo-réduction du couple U(IV)/U(VI) qui est de 0,27 V dans l'eau. L'uranium se stabilise dans l'eau sous la forme UO_2^+ et UO_2^{2+} respectivement, selon les équations (Paquet et al. 2009) :



En présence de ligands organiques ou inorganiques, la nature des espèces en solution formées par complexation avec l'uranium sera fonction de l'affinité des différents ligands vis-à-vis de cet actinide. La chimie de complexation des ions uranium en solution aqueuse est dominée par l'interaction avec des ligands oxygénés. Aussi la connaissance de la composition de la solution aqueuse est indispensable. Dans un environnement donné et selon le pH, différentes espèces seront présentes en solution, comme le

montre le diagramme de spéciation de l'uranium dans un milieu acétate par exemple (Figure 1), correspondant aux conditions expérimentales des études *ex vivo* présentées dans la seconde partie de ce manuscrit. Ce type de diagramme représente la distribution d'un élément sous ses différentes formes ou espèces chimiques, et permet de prendre en considération entre autres les problèmes de précipitation (Gilbin *et al.* 2009). A titre d'exemple, des précipités vont ici se former à partir d'un pH de 7,5, et environ 90 % de U sera sous forme solide à pH 8,4.

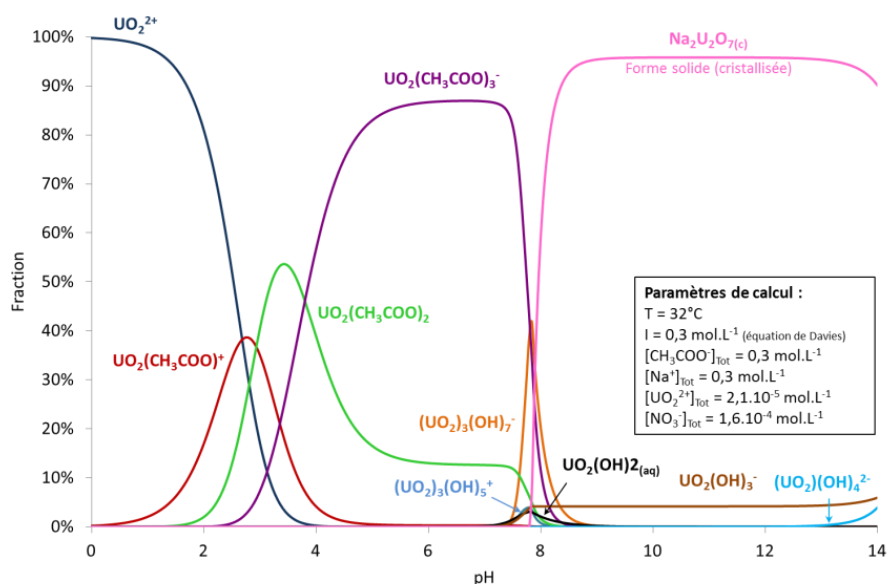


Figure 1 : Spéciation de l'ion uranyle en tampon acétate dans les conditions expérimentales *ex vivo* (logiciel MEDUSA)

1.3. Propriétés radiologiques

Dans l'état actuel des connaissances, 26 isotopes de l'uranium ont été identifiés, tous radioactifs, de la masse 217 à 242. Ils vont donc tendre vers la stabilité en se désintégrant par émission de rayonnements ionisants alpha (α), beta (β) et/ou gamma (γ) (Figure 2).

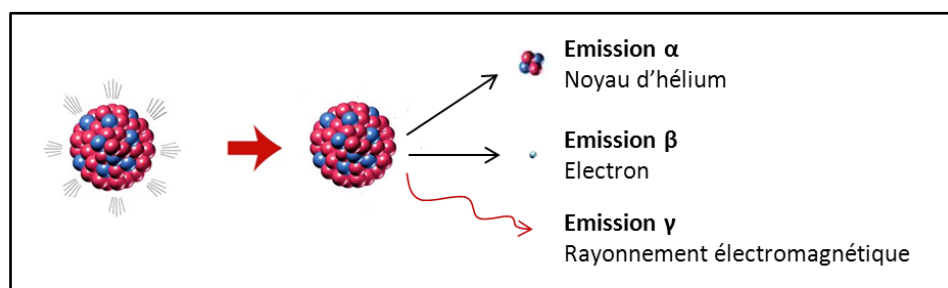


Figure 2 : La radioactivité, désintégration d'un noyau instable (Delacroix *et al.* 2006)

L'uranium est principalement un émetteur de particules α , et ses descendants des émetteurs de particules essentiellement β (Figure 3). Les rayonnements α possèdent un très faible pouvoir pénétrant de la matière, mais sont fortement ionisants. En effet, ces particules cèdent toute leur énergie sur une faible distance (quelques dizaines de micromètres), leur permettant ainsi d'ioniser les atomes de la matière traversée. Cela

peut entraîner, après pénétration de l'uranium dans les tissus, des perturbations qui sont plus importantes que celles induites notamment par les rayonnements gamma (γ) (Henge Napoli *et al.* 2001).

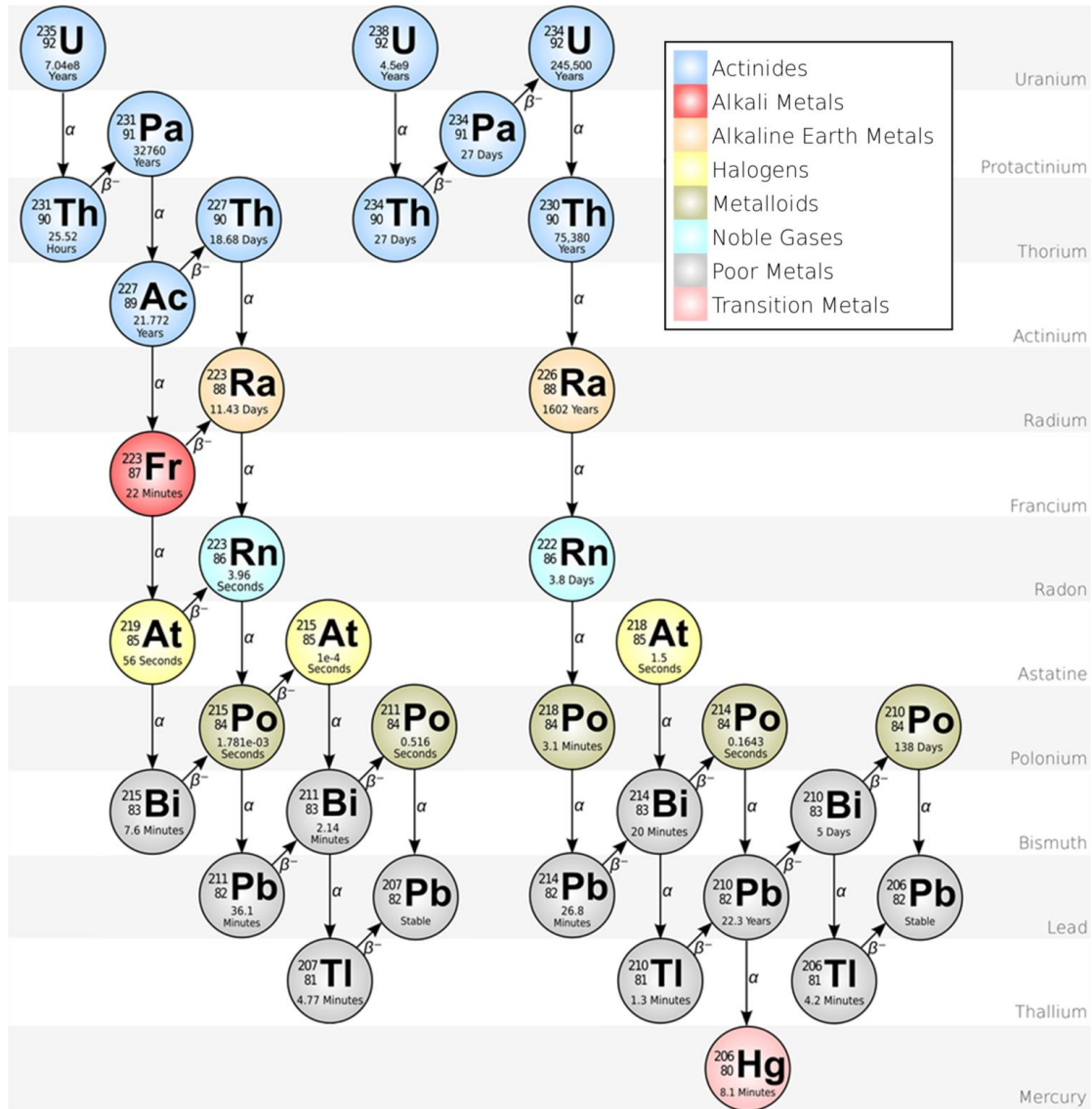


Figure 3 : Chaîne de décroissance de ^{235}U et ^{238}U (Nuclear-Forensics)

L'uranium est dit naturel lorsqu'il est composé des 3 isotopes existant à l'état naturel, dans leur proportion d'origine : ^{234}U (0,0054 %), ^{235}U (0,7110 %) et ^{238}U (99,2836 %) (Tableau 2). Les deux isotopes les plus abondants sur terre sont ^{238}U et ^{235}U . ^{234}U est produit par désintégration α de ^{238}U (émission d'un noyau d'hélium ^4_2He) et ne présente qu'une partie infime de la masse d'uranium totale. Cependant il représente l'isotope le plus radioactif. ^{235}U est quant à lui le seul isotope naturel aisément fissile lorsqu'il est bombardé par des neutrons, ce qui explique son intérêt énergétique et nucléaire. Les formes enrichies, appauvries ou de retraitement de l'uranium correspondent à des pourcentages variables de ces isotopes. A titre d'exemple, l'uranium enrichi contiendra entre 3 et 5 % de ^{235}U pour des applications civiles, ou plus de 90 % pour des applications militaires. A l'inverse, l'uranium dit appauvri contiendra une quantité plus faible de

cet isotope que l'uranium naturel, et aura ainsi une radioactivité moindre. C'est pourquoi nous utiliserons dans le cadre de nos études une solution contenant de l'uranium appauvri.

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux isotopes de l'uranium

Isotope	Abondance naturelle (masse %)	Période radioactive (an)	Activité massique (Bq.g ⁻¹)	Propriétés particulières
²³² U	-	68,9	8,27.10 ¹¹	-
²³⁴ U	0,0054	245 000	2,30.10 ⁸	Isotope naturel le plus radioactif
²³⁵ U	0,7110	704 millions	8,0.10 ⁴	Seul noyau naturel aisément fissile
²³⁶ U	-	23,4 millions	2,39.10 ⁶	-
²³⁸ U	99,2836	4,47 milliards	1,24.10 ⁴	Isotope naturel le plus courant

1.4. Métrologie

Différentes techniques de mesure peuvent être utilisées selon l'information recherchée (isotopie, concentration, spéciation), l'objectif final (recherche, contrôle, surveillance), ou encore selon la nature de l'échantillon (solide, liquide, gaz). Ces techniques d'analyses peuvent être classées selon deux grandes catégories. D'une part les techniques d'analyse dites nucléaires, basées sur l'interaction des émissions des isotopes de l'uranium avec la matière. Il existe parmi ces méthodes de mesure le comptage α et β , ainsi que la spectrométrie α . Les limites de détection sont alors de l'ordre de 1 mBq.L⁻¹ pour la première technique, et peuvent atteindre 0,2 mBq.L⁻¹ pour la seconde. D'autre part, il existe des techniques dites élémentaires, qui s'appuient sur la mesure de la masse d'uranium dans les échantillons. Ces méthodes regroupent entre autres la *Kinetic phosphorescence analysis* (KPA) dont la limite de détection est de l'ordre de 1 µg.L⁻¹, ou encore la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif (ICP-MS), technique de plus en plus utilisée pouvant atteindre des limites de détection de l'ordre du ng.L⁻¹ (Paquet *et al.* 2009). Cette technique, qui sera notamment employée pour le dosage de l'uranium dans la partie expérimentale de ce manuscrit, va être brièvement présentée.

L'ICP-MS est une technique de mesure élémentaire couplant un plasma induit à un spectromètre de masse quadripolaire, permettant la séparation des éléments en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Les échantillons liquides sont dans un premier temps transformés en aérosol par un nébuliseur à l'aide d'un flux d'argon, puis les plus fines gouttelettes sont transportées jusqu'à la torche où se forme un plasma d'argon. Après ionisation de l'échantillon dans le plasma, le faisceau d'ions est refocalisé par un jeu de lentilles. Les ions sont alors séparés selon leur rapport m/z par le quadripôle avant d'être détectés par un multiplicateur d'électrons, qui amplifie le signal avant de le transformer en signal informatique. Un ICP-MS peut être muni d'une cellule de collision/réaction permettant de réduire les interférences notamment poly-atomiques (Figure 4).

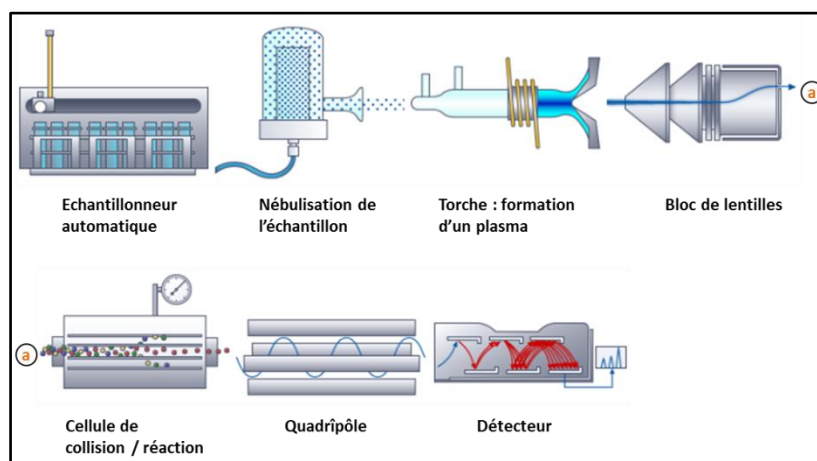


Figure 4 : Schéma de fonctionnement de l'ICP-MS
(Source : Agilent technologies)

1.5. Exploitation dans l'industrie nucléaire

Après extraction de minerai d'uranium provenant de gisements à ciel ouvert ou en galeries souterraines, celui-ci est concentré directement sur place afin d'obtenir une poudre jaune, appelée « *yellow cake* », contenant environ 75 % d'oxyde d'uranium en masse (EDF 2013). Sa teneur en ^{235}U , d'environ 0,7 %, n'est à ce stade pas suffisante pour alimenter les réacteurs nucléaires. C'est pourquoi le *yellow cake* est ensuite purifié et enrichi afin d'atteindre 3 à 5 % de ^{235}U , seul isotope naturel de l'uranium pouvant subir la fission nucléaire. Cet enrichissement se fait par étapes successives, en commençant par la dissolution du *yellow cake* dans de l'acide nitrique, puis la conversion de l'uranium en trioxyde d'uranium (UO_3), et selon différents procédés chimiques, en tétrafluorure d'uranium (UF_4) puis hexafluorure d'uranium (UF_6). Ce dernier est ensuite transformé en poudre d'oxyde d'uranium (UO_2). Il est alors conditionné en pastilles d'environ 7 grammes chacune, qui sont introduites dans des tubes métalliques long de 4 mètres, appelés crayons. Ces derniers sont ensuite assemblés et chargés au cœur du réacteur, constituant ainsi le combustible nucléaire (Bhattacharyya *et al.* 1995).

^{235}U dégage en effet une grande quantité d'énergie (environ $3,3 \times 10^{-11}$ J, soit 202,8 MeV) lorsque son noyau se scinde en deux noyaux plus petits sous l'impact d'un neutron. Cette fission s'accompagne également d'une libération de deux ou trois neutrons, qui provoquent à leur tour la fission d'un autre noyau de ^{235}U , induisant une réaction en chaîne (Figure 5). Cette réaction est contrôlée dans le cycle du combustible nucléaire pour éviter une augmentation exponentielle d'énergie libérée (Bhattacharyya *et al.* 1995, Viala 2001). C'est au contraire cette même réaction en chaîne qui est recherchée lors de l'utilisation d'une bombe nucléaire, dont l'enrichissement en ^{235}U est supérieur à 90 %.

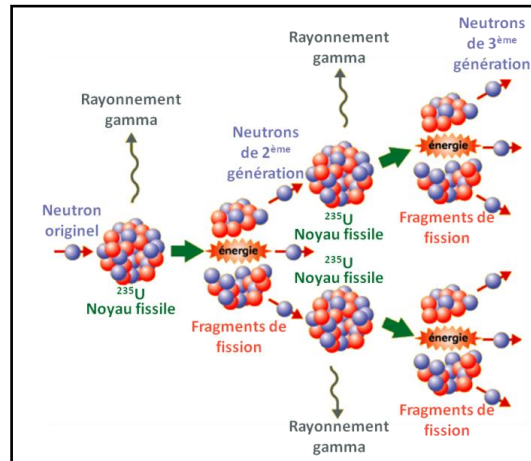


Figure 5 : Schéma de la réaction en chaîne de la fission nucléaire (Thieriot 2014)

Une fois utilisé, le combustible nucléaire est retraité afin de recycler l'uranium encore présent. Il peut être utilisé en moyenne trois à cinq ans dans le cœur du réacteur avant d'être épuisé en ^{235}U . Certains réacteurs peuvent également utiliser du combustible appelé *Mixed Oxyde fuel* (MOX), mélange d'oxyde de plutonium issu du traitement du combustible utilisé et d'uranium appauvri (U_a). L'uranium appauvri, produit dérivé de l'enrichissement, et les combustibles nucléaires usés sont ensuite entreposés en conteneurs jusqu'à décroissance de l'activité des éléments. Le cycle du combustible nucléaire est résumé par la figure 6.

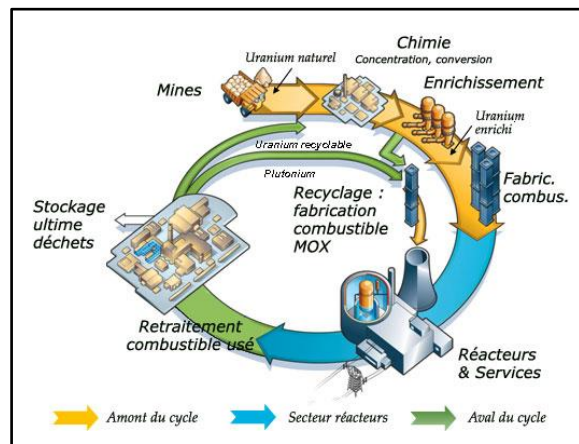


Figure 6 : Cycle du combustible nucléaire en France (De La Vaissière et al. 2007)

La France, qui compte 58 réacteurs, est la deuxième puissance électronucléaire au monde derrière les Etats-Unis. Bien que l'intervention de l'homme au cours du cycle du nucléaire soit rare, elle est parfois requise, et expose ce dernier à différentes formes chimiques de l'uranium comme des solutions aqueuses et organiques, ou encore sous forme de composés solides ou d'aérosol. En effet, l'exposition accidentelle de travailleurs à des radionucléides peut se produire lors des différentes étapes du cycle nucléaire : fabrication des éléments combustibles, retraitement du combustible usagé, démantèlement, traitement des déchets (Bhattacharyya et al. 1995). C'est dans ce contexte que seront présentés dans le chapitre suivant les différents types d'exposition aux radionucléides. La biocinétique de l'uranium ainsi que sa

toxicité seront également abordés. Enfin, les différents traitements de décontamination actuels seront présentés.

2. Les risques d'exposition à l'uranium dans l'industrie nucléaire et leurs impacts

2.1. Les différents types d'exposition

Deux types d'exposition aux radionucléides sont distingués ([Ansoborlo et al. 2003](#)) : l'exposition interne et l'exposition externe. Cette dernière concerne les cas où les radionucléides restent à l'extérieur de l'organisme, et vont provoquer une irradiation. Dans cette éventualité, le risque est lié aux rayonnements émis par les éléments, principalement si ces derniers sont pénétrants, comme les rayonnements γ , et, dans une moindre mesure, les rayonnements β . Cette exposition cesse dès que la source de rayonnement est suffisamment éloignée ou qu'un écran d'épaisseur suffisante est interposé entre l'individu et les éléments en question. Le risque d'une exposition externe est par conséquent très faible.

Au contraire, lorsque les radionucléides pénètrent à l'intérieur de l'organisme, il s'agit d'une exposition interne, appelée incorporation. Tous les rayonnements peuvent contribuer à l'exposition interne, y compris (et plus particulièrement) les particules α . Celles-ci vont céder plus brutalement leur énergie au voisinage immédiat de leur atome émetteur, et vont induire alors localement des dégâts cellulaires plus importants que par les rayonnements γ ([Métivier et al. 2001](#)). Cette contamination peut survenir par inhalation, par ingestion, ou encore par voie cutanée, notamment en cas de lésions. L'inhalation est considérée comme la voie de contamination la plus fréquente dans l'industrie nucléaire. Elle survient plus fréquemment après une explosion ou un incendie, provoquant une dispersion atmosphérique de radionucléides lors des pertes de confinement. La deuxième voie de contamination la plus fréquente après l'inhalation est la voie cutanée. Elle peut se produire notamment sur une peau blessée, à la suite d'une explosion ou d'une mauvaise manipulation d'objets tranchants contaminés à l'intérieur d'une boîte à gants. La peau peut également être contaminée directement par contact avec des aérosols ou par contact avec des surfaces contaminées par des radionucléides. L'ingestion est quant à elle une voie de contamination peu fréquente chez les travailleurs de l'industrie nucléaire car celle-ci est minimisée par les consignes d'hygiène et sécurité. En revanche, elle peut être plus critique vis-à-vis de la population en cas de rejet accidentel de la radioactivité dans l'environnement ([Gerber & Thomas 1992](#)).

La fréquence des contaminations pouvant survenir sur un site est illustrée par un bilan publié en 2004 ([Blanchin et al. 2004](#)), portant sur la prise en charge d'individus potentiellement contaminés par expositions internes lors d'incidents recensés entre 1996 et 2002 sur le site du Commissariat de l'Energie Atomique (CEA) de Cadarache. Ainsi, sur les 1529 incidents d'expositions internes traités durant cette période, environ 88 % concernent une suspicion d'inhalation et 11 % une suspicion de contamination par plaies. Un second rapport recensant 548 cas d'exposition aux radionucléides dans les centres CEA-AREVA

entre 1970 et 2003 (Grappin *et al.* 2007a) montre que la contamination par des actinides par voie cutanée en présence ou non de blessure n'est pas négligeable puisqu'elle constitue ici la première voie de contamination avec 53,8 % des cas, suivie de près par l'inhalation représentant 39,5 % des cas (Figure 7).

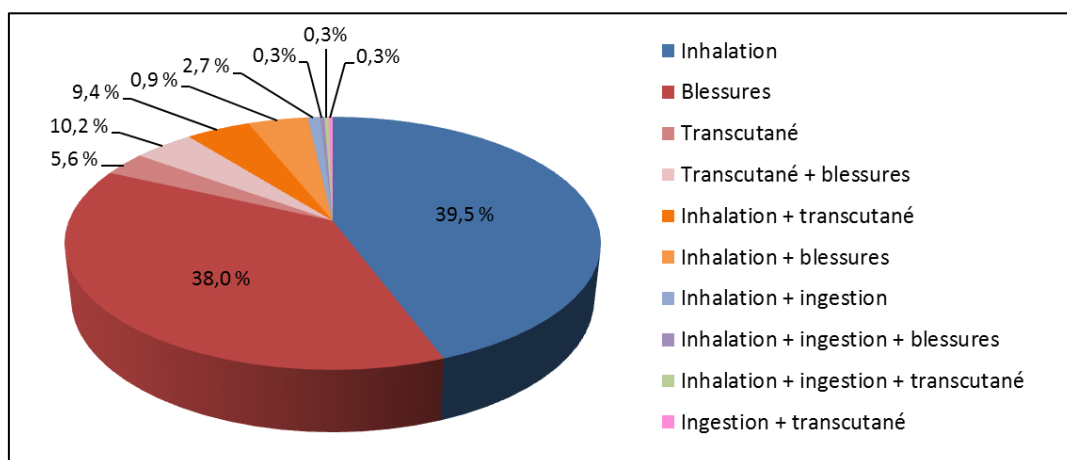


Figure 7 : Recensement de la fréquence des différentes voies de contamination entre 1970 et 2003 dans les centres CEA-AREVA (Grappin *et al.* 2007b)

2.2. Biocinétique de l'uranium

Du fait du passage de l'uranium dans le corps lors d'une contamination interne par cet actinide, il apparaît important de connaître sa biocinétique, c'est-à-dire son comportement dans l'organisme. Cela passe par l'absorption, la distribution puis l'accumulation de cet élément dans les organes de rétention, jusqu'à son élimination.

Comme décrit précédemment, l'uranium peut pénétrer dans l'organisme par inhalation, par ingestion, ou encore par transfert au travers de la peau. Ce chapitre portera plus spécifiquement sur la biocinétique de l'uranium après passage de celui-ci au niveau transcutané, en vue de mieux comprendre son devenir lors des études qui seront présentées par la suite.

Après passage de l'uranium au travers de la peau, qu'elle soit intacte ou lésée, le radionucléide se retrouve au niveau de la circulation sanguine. Bien qu'il existe sous deux états d'oxydation principaux (IV et VI), en milieu biologique l'uranium est présent uniquement sous forme d'ion uranyle à l'état d'oxydation VI (UO_2^{2+}). La biodistribution de l'uranium dépend de l'organisme étudié, mais d'une façon générale, une fois celui-ci présent dans la circulation sanguine, une partie de la charge systémique est très rapidement retenue par les organes cibles que sont les reins et le squelette, l'autre partie étant directement éliminée par voie urinaire principalement au cours des 24 premières heures suivant la contamination (Figure 8). Le foie et les tissus mous fixent l'uranium dans une moindre mesure (Ansoborlo *et al.* 2003). Après passage de l'uranium au niveau sanguin, cet actinide est également détectable dans le cerveau, les testicules et les ganglions lymphatiques, mais à des concentrations inférieures que celles retrouvées dans les reins. A titre d'exemple, il a été détecté respectivement 46, 12, et 7,5 fois moins

d'uranium dans le cervelet, les ganglions lymphatiques et les testicules que dans les reins de rats ayant subi une implantation de pastilles d'uranium appauvri dans le muscle 18 mois auparavant (Pellmar *et al.* 1999).

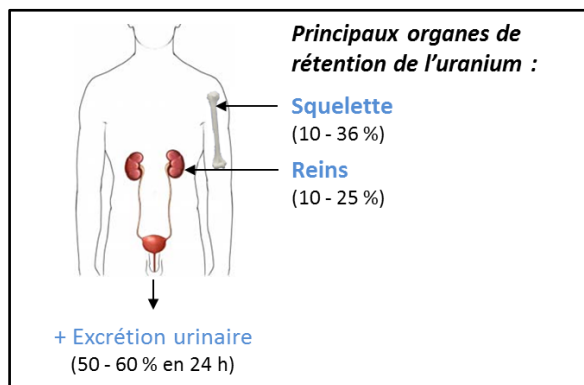


Figure 8 : Répartition moyenne de l'uranium après incorporation dans le corps humain, 24 h après contamination

Des études ont également été réalisées directement chez l'homme dans les années 1950 (Bernard *et al.* 1957), afin de suivre, après injection intraveineuse de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou de UCl_4 , la distribution et l'excrétion de l'uranium. Ces études, nommées "études de Boston", ont été menées chez des patients atteints de tumeurs cérébrales en phase terminale. Elles démontrent une excrétion urinaire rapide de l'uranium, de 18,5 à 69 % selon la valence et la quantité d'uranium injectée. En moyenne, 24 h après contamination, environ 44 % de l'uranium sont excrétés par voie urinaire. 2,5 jours après contamination, la répartition est de 66 % dans les urines, 16 % dans les reins, 10 % dans le squelette contre seulement 0,1 % dans le sang.

De même, des données obtenues chez le rat (Hengé-Napoli *et al.* 1998) et la souris (Durbin *et al.* 1998) dans le cadre d'études de décorporation donnent respectivement la répartition suivante de l'uranium après 24 h de contamination : 44 et 59 % dans les urines, 16 et 18 % dans les reins, et 36 et 16 % dans le squelette.

D'après les prédictions d'un modèle biocinétique de l'uranium développé à partir de données obtenues chez le rat (Leggett & Pellmar 2003), environ 50 % de l'uranium présent dans la circulation sanguine est directement éliminé par voie urinaire, environ 5 % par voie fécale, environ 20 % se dépose dans le squelette et environ 20 % s'accumule directement dans les reins.

Parmi les complexes formés dans le sang par les ions uranyle, des liaisons avec des ligands de faibles poids moléculaires tels que les citrates et les carbonates vont apparaître. Ils seront alors filtrés au niveau du glomérule rénal (Figure 9), ainsi que d'autres complexes se formant également avec les protéines plasmatiques, telles que la transferrine (protéine de transport du fer) ou l'albumine (protéine produite par le foie). Ces complexes n'étant pas stables, ils se dissocieront au profit des complexes formés avec les carbonates au fur et à mesure que ceux-ci seront éliminés par clairance rénale. Cependant, bien qu'après passage de cette barrière rénale, une partie de l'uranium soit excrétée par voie urinaire, une autre partie

de l'uranium se fixe quant à elle au niveau des cellules tubulaires proximales du néphron (Bleise *et al.* 2003, Souidi *et al.* 2009).

Au niveau du squelette, les ions uranyle UO_2^{2+} vont se substituer aux ions calciques Ca^{2+} à la surface des os, en particulier au niveau des zones de croissance, qui sont vascularisées et où la calcification y est active (Leggett & Pellmar 2003, Pellmar *et al.* 1999, WHO 2001). Contrairement au rein qui, comme décrit précédemment, peut éliminer assez rapidement l'uranium, l'élimination de ce radionucléide stocké au niveau osseux est beaucoup plus lente. En effet, la moitié de l'uranium déposé en surface mettra entre 1 et 5 jours avant de retourner dans la circulation sanguine. L'autre partie est, quant à elle, transférée vers le volume de l'os lors du remodelage osseux, et 25 % de cette quantité sera fixée dans une zone osseuse non échangeable (Paquet *et al.* 2009).

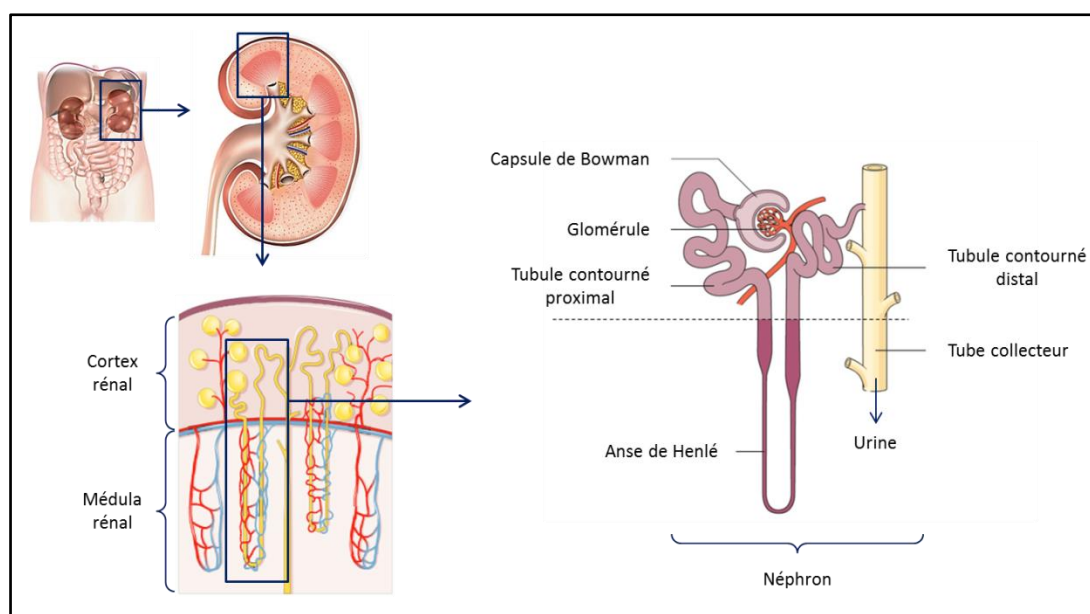


Figure 9 : Schéma fonctionnel du rein

Des études chez le rat ont également montré que dans une moindre mesure, l'uranium peut traverser la barrière hémato-encéphalique et se retrouver dans certaines parties du système nerveux central telles que l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet, mais également au niveau des organes reproducteurs et des ganglions lymphatiques (Domingo 2001, Houpert *et al.* 2005, Lestaevel *et al.* 2005).

2.3. Toxicité de l'uranium

L'uranium a une double toxicité : à la fois une toxicité chimique de métal lourd, mais également une toxicité radiologique qui est fonction de son isotopie et de son degré d'enrichissement en ^{235}U . Ainsi, en cas de contamination par de l'uranium enrichi, le risque radiochimique sera d'autant plus important que l'activité du composé uranifère sera élevée. A l'inverse, en cas de contamination par de l'uranium naturel ou appauvri, la toxicité de l'uranium sera principalement due à ses propriétés chimiques (Henge Napoli *et al.* 2001, Souidi *et al.* 2009, WHO 2001).

La quantité nécessaire d'uranium pour induire une toxicité radiologique est très supérieure à celle nécessaire pour que la toxicité chimique soit fatale (Bouquin *et al.* 2003, Kathren & Burklin 2008). De plus, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur les effets radiologiques de l'uranium, notamment au niveau rénal. C'est la raison pour laquelle le prochain chapitre sera consacré plus particulièrement à sa toxicité chimique.

La chimiotoxicité de l'uranium est essentiellement fonction de la quantité en masse d'uranium incorporée, de la voie d'entrée du composé et de sa solubilité, ainsi que de son temps d'exposition (Cazoulat *et al.* 2012). En effet, un composé très soluble tel que le nitrate d'uranyle diffusera très rapidement dans la circulation sanguine et les fluides biologiques et sera distribué aux organes cibles comme vu précédemment. Au contraire, un composé peu soluble, comme le dioxyde d'uranium, ne libérera que très peu d'ions diffusibles et aura tendance à rester au niveau du site d'incorporation (Bérard *et al.* 1994a, Henge Napoli *et al.* 2001). De plus, les effets toxiques aigus (exposition à une forte concentration sur une courte durée) observés pourront parfois être différents des effets toxiques chroniques (expositions répétées de faibles doses). Ces derniers sont par ailleurs un peu moins connus à l'heure actuelle, contrairement aux effets de la toxicité aiguë (Souidi *et al.* 2009). La toxicité de l'uranium chez l'animal est majoritairement rénale et osseuse, qu'elle soit aiguë ou chronique.

En effet, le rein est connu pour être l'organe cible le plus sensible à la toxicité chimique de l'uranium. Cette néphrotoxicité est induite par la fixation de cet élément au niveau des cellules tubulaires proximales, provoquant alors des lésions membranaires et ainsi la mort des cellules concernées. Cela provoque également des changements morphologiques au niveau de la structure du glomérule ainsi que des anomalies fonctionnelles, notamment au niveau des phénomènes de réabsorption. La sévérité et la réversibilité des lésions peuvent être variables : la toxicité augmente avec l'accumulation en masse d'uranium dans les reins, et dépend également du temps d'exposition (Diamond 1989, Ozmen & Yurekli 1998, Pellmar *et al.* 1999, Souidi *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2009). La Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP) a recommandé une concentration maximale admissible en uranium dans les reins chez l'homme de $3 \mu\text{g.g}^{-1}$ (ICRP 1959). Cette valeur est cependant très discutée à l'heure actuelle, puisque des lésions rénales, notamment des nécroses tubulaires et cellulaires, ont été observées chez le rat à des concentrations bien inférieures ($0,7$ à $1,4 \mu\text{g}$ d'uranium par gramme de rein) (Diamond 1989, Souidi *et al.* 2009).

De plus, bien que la dose rénale décroisse au cours du temps, des études montrent que l'uranium est toujours présent 360 jours après exposition (Zhu *et al.* 2009). Enfin, les composés d'uranium les plus solubles tels que le nitrate d'uranyle se sont avérés être les plus toxiques, allant jusqu'à provoquer la mort suite à des lésions rénales chez l'animal tel que le rat, le cobaye ou autres petits animaux de laboratoire, avec une variation plus ou moins grandes de la sensibilité entre espèces. Il faut cependant noter qu'il n'y a

pas eu connaissance de décès chez l'homme attribuable à un empoisonnement à l'uranium, laissant penser que ce dernier est peut-être moins sensible que les autres mammifères étudiés aux effets toxiques aigus et chroniques de ce radionucléide (De Rey *et al.* 1983, Kathren & Burklin 2008).

La fixation osseuse de l'uranium est également un critère à prendre en compte dans l'évaluation de la toxicité de l'uranium, puisqu'il est connu que les ions uranyle vont se substituer aux ions calciques à la surface des os (§ 2.2). Il a en effet été constaté que le squelette est une cible potentielle de la toxicité, avec notamment l'observation chez le rat d'une diminution de la croissance radiale de l'os cortical (parois externe des os) après ingestion chronique d'eau de boisson contaminée. Aucun effet n'a cependant été détecté sur les os d'animaux adultes (Wade-Gueye *et al.* 2012). D'après cette étude, la toxicité de l'uranium semble donc cibler principalement les zones de croissance osseuse et pourrait par conséquent affecter la résistance osseuse. Pour ces raisons, il paraît nécessaire de porter une attention particulière aux enfants lors d'une exposition chronique à l'uranium au niveau osseux.

La neurotoxicité chez l'homme n'a pas clairement été démontrée, bien qu'une étude révèle des troubles du comportement tels que des états de dépression ou d'agitation chez des travailleurs exposés à de fortes doses d'uranium (Howland 1949, Souidi *et al.* 2009). Bien que moins importante dans les reins ou le squelette, l'accumulation d'uranium dans le système nerveux central (hippocampe et hypothalamus), mais aussi au niveau des glandes surrénales, aurait des effets sur la santé et les paramètres électrophysiologiques. En effet, des études chez le rat montrent que cela aurait un impact sur le sommeil paradoxal de l'animal, et diminuerait sa prise alimentaire ainsi que sa capacité de mémoire spatiale (Houpert *et al.* 2005, Lestaevel *et al.* 2005).

Enfin, plusieurs études relatives aux effets de l'uranium sur la reproduction ont été menées, principalement chez le rat et la souris, mâle ou femelle, utilisant diverses voies de contamination. Il en résulte entre autre une toxicité maternelle et fœtale : réduction de la prise de poids et de la prise alimentaire pour la mère et diminution du poids et de la longueur du fœtus, accompagnées de malformations et parfois de troubles voire d'absence d'ossification du squelette. Dans le cadre de ces études, aucun effet sur la fertilité n'a été démontré, bien qu'une diminution du nombre de nouveau-nés soit parfois constatée, due à une augmentation de la mortalité *in utero*. Aucun effet défavorable lié à la dose n'a également été observé sur le développement post-natal et le comportement de la progéniture. Néanmoins, ces résultats obtenus chez le rat ne peuvent être extrapolés sans risques aux autres espèces (Arfsten *et al.* 2006, Domingo 2001, Domingo *et al.* 1989, Sánchez *et al.* 2006).

2.4. Traitements actuels des contaminations

En cas d'évènement susceptible d'entraîner une radiocontamination, et quel que soit son degré, l'urgence médico-chirurgicale prime, mettant en œuvre en priorité les gestes vitaux. La victime est ensuite évacuée le

plus rapidement possible vers une zone de mise à l'abri. L'objectif est alors soit de réduire la pénétration dans l'organisme des radionucléides à partir du site d'entrée, soit d'accélérer leur élimination par voie naturelle.

Après une première étape de déshabillage selon la localisation et le mode de contamination, la personne contaminée est douchée à l'eau tiède savonneuse (ASN 2008). Si le radionucléide est déjà présent dans l'organisme (après contamination par inhalation, ingestion, blessure cutanée), le traitement actuel consiste à administrer une ou plusieurs injections par voie intraveineuse d'une solution contenant 0,5 g de sel calcique d'acide diéthylène triamine pentaacétique (Ca-DTPA) en cas de contamination par des actinides transuraniens (Bhattacharyya *et al.* 1995, Grappin *et al.* 2007a).

Cependant, l'administration de DTPA consécutive à une contamination par un composé contenant de l'uranium est susceptible de potentialiser les effets néphrotiques de l'uranium décrit précédemment. En effet, l'absorption rénale de l'uranium au niveau des cellules tubulaires proximales peut provoquer de nombreux dysfonctionnements tels que des lésions de la membrane, la mort des cellules ciblées, des changements morphologiques dans la structure du glomérule ou encore des anomalies fonctionnelles du rein. Néanmoins ces interactions sont discutées et restent à être confirmées (Houpert *et al.* 2003, Muller & Houpert 2006). De plus, pour une efficacité maximale, il est nécessaire de traiter les victimes de contaminations au plus vite (ASN 2008). Il n'en demeure pas moins que les différentes étapes de prise en charges des personnes peuvent considérablement allonger le délai écoulé entre le moment de contamination et le traitement.

A l'issu de ce chapitre, il apparaît donc très clairement que la contamination à l'uranium par voie cutanée, notamment en cas de blessures, présente une voie d'entrée non négligeable pouvant conduire à des effets toxiques préoccupants. C'est pourquoi le développement de traitements de décontamination dans le cas de contamination cutanée à l'uranium est nécessaire.

Aussi le prochain chapitre abordera les différents modes de contaminations par voie cutanée, et recensera également les différents traitements d'urgences disponibles et ceux actuellement à l'étude dans le cas particulier de l'uranium.

3. La contamination cutanée par l'uranium

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'une contamination cutanée à l'uranium, ce chapitre s'attachera tout d'abord à présenter l'anatomie et la physiologie de la peau humaine, ainsi que les mécanismes d'absorption et de diffusion survenant au travers de ce tissu. Les similitudes entre la peau de l'homme, du porc, et du rat seront ensuite comparées pour mieux appréhender les différents modèles d'étude de la diffusion transdermique. Les différents travaux de diffusion transdermique menés sur des peaux intactes ou lésées, après contamination cutanée par l'uranium, seront alors exposés. Enfin, après la

présentation des traitements actuellement employés, les principales études portant sur la mise au point de traitements d'urgence spécifiques de la contamination cutanée par l'uranium seront discutées.

3.1. La peau humaine

Avec une surface moyenne de 2 m² chez l'homme, la peau représente le plus vaste organe du corps, soit environ 10 à 15 % de la masse corporelle totale d'un adulte. Elle assure une barrière protectrice vitale vis-à-vis de l'environnement extérieur, notamment contre les micro-organismes, et protège aussi des rayons ultraviolets ou encore des contacts mécaniques qui sont autant d'agressions contre lesquels la peau doit faire face. Elle possède également un rôle très important de thermorégulation par la rétention ou l'élimination d'eau et protège ainsi l'organisme de la déshydratation (Le Perchec 2014).

3.1.1. Anatomie et physiologie

La peau doit sa souplesse et sa résistance aux différentes couches tissulaires qui la constituent. En effet, elle est composée de trois structures tissulaires principales superposées et communicantes, qui de la couche externe à la couche la plus profonde se nomment l'épiderme, le derme et l'hypoderme, l'épiderme et le derme étant séparés par la jonction dermo-épidermique, couche mince située sous la couche basale. D'une épaisseur totale de moins de cinq millimètres, l'ensemble derme - épiderme contient les molécules naturelles de la protection (kératines), de la couleur (mélanines) et de la nutrition (polyglucosides, lipides, vitamines) (Le Perchec 2014). Les annexes épidermiques, composées des follicules pileux, des glandes sébacées annexées aux follicules pileux et sécrétant le sébum, ainsi que des glandes sudoripares qui sécrètent la sueur, forment des invaginations de l'épiderme dans le derme (Figure 10). Elles représentent environ 0,1 % de la surface totale de la peau. Les différentes structures cutanées vont maintenant être abordées plus en détail.

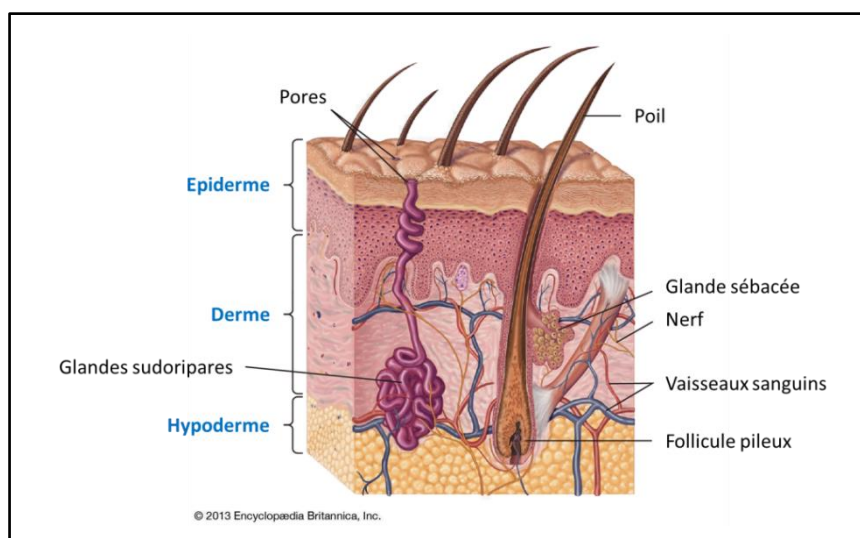


Figure 10 : Schéma de la structure de la peau

3.1.1.1. Epiderme

L'**épiderme** est la couche externe de la peau assurant son imperméabilité et sa résistance. Il consiste en un épithélium épais pavimenteux stratifié dont l'épaisseur peut varier selon les régions anatomiques, en moyenne de 100 μm (Martini 2006). L'épiderme est principalement constitué de **kératinocytes**, cellules synthétisant la kératine, elle-même absorbant la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau. Ces kératinocytes ont la particularité de se transformer progressivement au cours du phénomène de kératinisation, en migrant de la face profonde de l'épiderme à la surface de celui-ci, formant alors quatre couches distinctes ayant chacune sa spécificité. De l'intérieur vers l'extérieur se trouvent (Figure 11) :

- La couche basale, appelée aussi couche germinative ou *stratum germinativum*,
- La couche épineuse, connue aussi sous le nom de corps rugueux de Malpighi, ou *stratum spinosum*. Elle contient les cellules immunitaires ou cellules de Langerhans.
- La couche granuleuse ou *stratum granulosum*,
- La couche cornée ou *stratum corneum*.

L'ensemble des couches basales, épineuse et granuleuse de l'épiderme est couramment appelé épiderme viable. L'épiderme se renouvelle toutes les quatre semaines environ par l'élimination des cellules mortes superficielles (Le Perchec 2014).

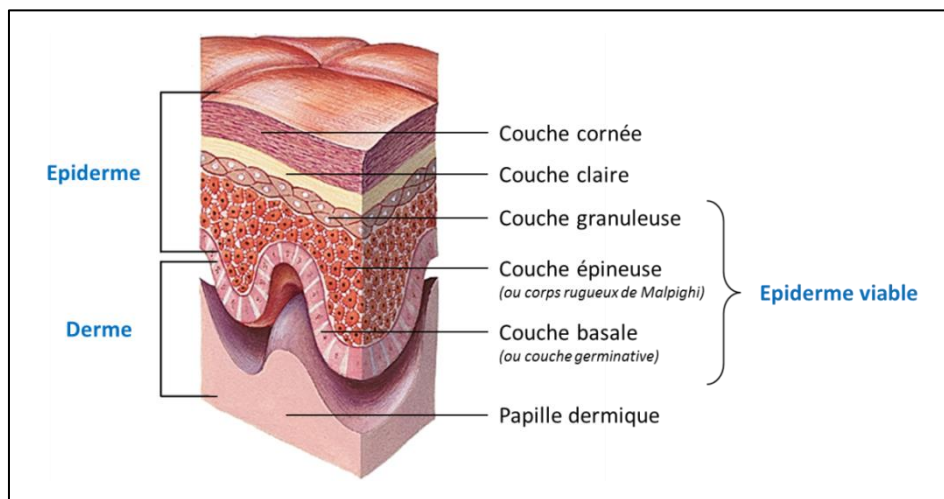


Figure 11 : Structures de l'épiderme
(Larousse.fr)

Les cellules basales de la **couche germinative** se situent dans la strate profonde de l'épiderme au niveau de la jonction dermo-épidermique, et régénèrent continuellement le tissu épithélial kératinisé. En quelques semaines ces jeunes cellules migrent à la surface, s'aplatissent, et se kératinisent. Environ 50 % de ces cellules sont en mitose, et jouent ainsi le rôle de cellules mères en se multipliant et produisant les cellules de la couche immédiatement supérieure, la **couche épineuse** (Le Perchec 2014).

Au sein de cette nouvelle couche, les cellules, polyédriques à noyau arrondi, sont solidement attachées entre elles par des liens de nature protéiques appelés **desmosomes**, et forment 5 à 10 assises cellulaires. Tout en migrant en un flux continu vers la surface de la peau, ces cellules cessent tout cycle de division et débutent leur différenciation. Elles commencent alors à s'étirer et à s'enrichir en kératine dans la couche granuleuse : le phénomène de **kératinisation** débute.

La **couche granuleuse** est la dernière couche dite vivante de l'épiderme. Elle est composée de 2 à 5 couches de cellules, de forme aplatie. Ces cellules vont alors continuer à s'aplatir au fur et à mesure de leur migration vers la surface épidermique, et perdre leur noyau pour se transformer en cornéocytes, stade ultime de la kératinisation.

Ces **cornéocytes**, constitués en grande majorité de kératine (protéine extrêmement résistante) et presque totalement déshydratés, sont des cellules aplaties d'environ 4 µm de diamètre sur 0,1 µm d'épaisseur qui assurent la fixation de l'eau, et sont spécifiques de la **couche cornée**. Ces cellules sont agrégées par un ciment intercellulaire lipidique : mélange d'acides gras polyinsaturés, de cholestérol et de céramides. De plus leur cohésion est assurée par des liens protéiques représentés par les **cornéosomes**.

De composition biochimique totalement différente des couches sous-jacentes de l'épiderme, la couche cornée est organisée de façon très schématique à la manière d'un mur de briques, d'environ 10 à 20 µm, et est constituée de 2 à 3 couches de cellules mortes et anucléées. La partie la plus profonde de la couche cornée, appelée *stratum compactum*, est constituée de cellules cohésives, et représente la couche cornée proprement dite. La partie la plus superficielle, appelée *stratum disjonctum*, est quant à elle composée de cellules discohésives. Les cellules mortes de cette couche sont continuellement éliminées par le processus de desquamation, et sont alors remplacées par les cellules provenant des couches inférieures. Une troisième couche, plus profonde que les deux premières, peut être également présente : le *stratum lucidum*. Celle-ci n'est retrouvée qu'au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds ([Dublineau et al. 2009](#)).

Bien qu'ayant une épaisseur minime par rapport à l'épaisseur totale de la peau, la couche cornée est responsable de "l'effet barrière", élément protecteur principal. En effet, cette barrière, constituée de 15 à 20 couches de cellules, est quasi imperméable grâce à sa structure anatomique et sa constitution chimique, si son intégrité est respectée. Elle empêche la pénétration à travers la peau de substances exogènes, ralentit la diffusion de l'eau en provenance des couches profondes du derme, et participe de façon active à l'hydratation cutanée ([Martini 2006](#)).

Dans la littérature, plusieurs exemples témoignent de l'effet barrière de la couche cornée lorsque celle-ci est intacte. En effet, il a été démontré que cette protection était notamment influencée par le degré d'hydratation cutanée. Si la couche cornée est hydratée de façon excessive par l'intermédiaire de patch

occlusif, les cornéocytes, hyperhydratés, perdent leur capacité de barrière et deviennent perméables dans les deux sens. De la même façon, cet effet barrière est considérablement diminué dans le cas d'une peau excessivement desséchée, qui perd alors sa souplesse et se craquelle, lésant ainsi la couche cornée. Enfin, si cette couche est totalement retirée par la méthode du *stripping*, méthode par ailleurs utilisée dans le cadre de nos études, la perméabilité de la peau augmente également. Il en est de même lors de scarifications ou encore en cas de brûlures de la peau ([Hadgraft & Lane 2005](#), [Petitot 2010](#)).

La **jonction dermoépidermique** relie la couche basale de l'épiderme et le derme. Sa structure ondulée permet d'avoir une surface de contact maximale entre l'épiderme et le derme.

3.1.1.2. Derme

Le derme est le tissu de soutien sur lequel repose l'épiderme. D'une épaisseur moyenne d'environ 500 µm à 1 mm, ce tissu conjonctif joue un rôle majeur dans le maintien des propriétés mécaniques de la peau. En effet, il est composé, entre autres, de protéines synthétisées par les fibroblastes, dont notamment le collagène, l'élastine et la fibronectine, qui confèrent à la peau sa résistance, son élasticité et sa souplesse.

Contrairement à l'épiderme qui ne renferme que très peu d'eau (en moyenne 13 %), le derme sert de réservoir par l'intermédiaire du gel de protéoglycanes, lui permettant de contenir 70 à 80 % d'eau ([Martini 2006](#)). Il est également impliqué dans la thermorégulation, la cicatrisation et la défense contre les pathogènes grâce à la présence de cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T.

Sont aussi présents dans le derme toutes les structures vivantes telles que les vaisseaux sanguins permettant la nutrition de la peau par diffusion, un important réseau de terminaisons nerveuses, les follicules pileux, ainsi que les glandes sudorales et sébacées. Ces dernières sécrètent le sébum, une substance grasseuse et acide, indispensable à la lubrification de la peau et à sa protection contre de nombreuses bactéries ([Le Perchec 2014](#)).

3.1.1.3. Hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde et la plus épaisse de la peau. Contrairement aux autres strates cutanées, il n'existe pas de séparation nette entre le derme et l'hypoderme. Formé d'un tissu conjonctif lâche, ce dernier possède une structure identique à celle du derme, mais contient principalement du collagène et du gel de protéoglycanes. Il est également composé d'adipocytes, cellules grasseuses présentes sous forme d'amas et stockant les triglycérides, qui confèrent à l'hypoderme un pouvoir d'isolant thermique. La présence de lipides et d'acides gras permettent également à l'hypoderme de jouer un rôle de réservoir énergétique.

3.1.1.4. Vascularisation et innervation

Contrairement à l'épiderme qui n'est pas vascularisé, le derme et l'hypoderme présentent un réseau extrêmement abondant de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Cette riche vascularisation assure l'oxygénation et la nutrition des différentes couches cellulaires de la peau, et joue aussi un rôle primordial dans sa thermorégulation. La vascularisation, notamment au niveau du derme, intervient également dans les phénomènes d'absorption transcutanée, par résorption d'une partie des molécules ayant initialement traversées la couche cornée et diffusées au travers de l'épiderme. Ce dernier, bien que non irrigué directement par les vaisseaux sanguins, reçoit tout de même les nutriments qui lui sont nécessaires par diffusion à partir du derme.

L'innervation cutanée est également très importante et concerne essentiellement le derme, l'épiderme ne recevant que des terminaisons nerveuses. Cette innervation est assurée par les terminaisons nerveuses libres, constituées de fibres neurovégétatives qui innervent principalement les annexes cutanées et les vaisseaux sanguins, ainsi que par les corpuscules sensitifs, à la base du sens du toucher (Martini 2006).

3.1.1.5. pH cutané

Le pH à la surface de la peau varie selon les zones anatomiques considérées, mais également selon les individus. Le pH cutané, en général compris entre 4,2 et 5,8, est régulé par l'excrétion sudorale qui joue un rôle de tampon permettant de rétablir efficacement ce pH. Plusieurs facteurs extérieurs peuvent influencer ce pH, comme le lavage par des détergents. Il peut également augmenter avec l'âge, et est plus alcalin chez les femmes. Le pH du derme est quant à lui d'environ 7.

3.1.2. Absorption et cinétique de diffusion percutanée

L'**absorption cutanée** regroupe l'ensemble des mécanismes qui assurent le passage dans la circulation sanguine d'une substance appliquée sur la peau. Ce processus se décompose en trois étapes :

- La **pénétration cutanée**, c'est-à-dire l'entrée de la substance dans les premières couches de cellules de la couche cornée,
- La **perméation**, décrivant le cheminement de la molécule au travers des différentes assises de la peau,
- L'**absorption** ou **résorption**, correspondant à son entrée dans le système vasculaire.

Aussi les chapitres suivants décriront les mécanismes d'absorption et de diffusion mis en jeu au travers de la peau, qui seront utiles, par la suite, pour la compréhension de la diffusion transcutanée de l'uranium.

Voie de passage transcutané

La traversée de la couche cornée est l'étape principale de l'absorption cutanée. En effet une substance peut traverser les strates de la couche cornée selon trois voies différentes (Hadgraft 2001, Roberts *et al.*

2002). Les deux premières voies, majoritairement empruntées, sont les voies intercellulaires et transcellulaires (Figure 12). Un troisième type de passage peut également être rencontré bien que minoritaire, il s'agit de la voie annexielle.

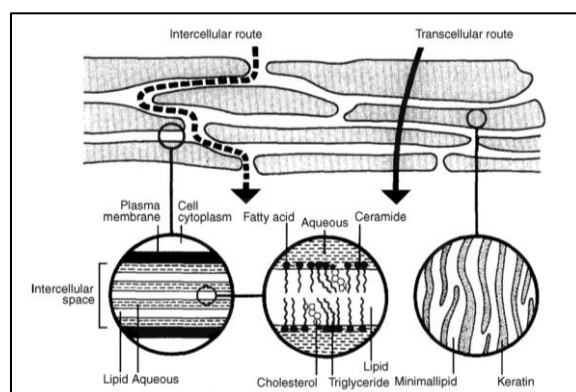


Figure 12 : Schéma des principales voies de passage transcutané (El Maghraby *et al.* 2008)

Lors de la pénétration par **voie intercellulaire**, les molécules empruntent les voies tortueuses que forme le ciment lipidique intercellulaire. De par sa structure en bicouche lipidique, ce milieu offre à la fois des régions hydrophiles et lipophiles. Bien que la distance à parcourir soit plus longue, le passage de nombreux composés hydrophiles, lipophiles ou amphiphiles sera plus rapide en raison d'un plus grand coefficient de diffusion dans le milieu intercellulaire.

La **voie transcellulaire** est quant à elle essentiellement empruntée par les molécules de petites tailles, généralement hydrophiles, qui doivent traverser successivement les cornéocytes polaires et l'espace intercellulaire apolaire. Les substances plus ou moins lipophiles peuvent également emprunter ce passage grâce aux pontages suffisamment amphiphiles reliant les cornéosomes entre eux.

La **voie annexielle** peut elle aussi être rencontrée. Les annexes cutanées ne représentant qu'environ 1 % de la surface de la peau, cette voie est cependant minoritaire. Elle correspond au passage des molécules directement par les follicules pilosébacés (voie transfolliculaire), ainsi que par le canal sudoripare et les glandes eccrines, ce qui est théoriquement possible mais rarement mis en évidence. (Hadgraft 2001, Martini 2006, Roberts *et al.* 2002)

Cinétique du passage transcutané

La cinétique de diffusion d'une substance au travers de la peau, c'est à dire la vitesse à laquelle elle va traverser ses différentes strates, en particulier celles de la couche cornée, dépend de plusieurs facteurs. La diffusion trans-épidermique d'une molécule varie notamment selon l'état de la peau, son épaisseur ou encore selon son degré d'hydratation (chapitre (§) 3.1.1). Ainsi une peau lésée est plus perméable qu'une peau intacte puisque l'effet barrière de la couche cornée n'est plus totalement assuré. Il en est de même pour la peau d'un enfant qui est plus perméable que celle d'un adulte.

Les caractéristiques physico-chimiques des molécules au contact de la peau sont également à prendre en compte. En effet, la taille des molécules est un des principaux facteurs influençant le passage trans-épidermique : celui-ci est d'autant plus facilité que la masse molaire est peu élevée (Martini 2006). La nature chimique et la forme des molécules sont autant de paramètres à prendre également en considération. Ainsi, des molécules de forme plutôt ramassée auront plus de facilité à s'insinuer entre les cornéocytes que de longues molécules linéaires plus ou moins ramifiées. De même, des molécules amphiphiles seront plus aptes à pénétrer la barrière cutanée que des molécules lipophiles, qui auront plus tendance à s'accumuler dans le ciment intercellulaire, ou que des substances hydrophiles qui ne pourront traverser la peau que si elle est hydratée au maximum. C'est pourquoi les tensio-actifs, outre leur rôle en tant qu'excipients permettant de moduler la pénétration de molécules actives, ont une certaine capacité de pénétration de par leur amphiphilie (Martini 2006).

Le véhicule dans lequel se trouve la molécule étudiée peut également avoir un impact sur son absorption percutanée, tant par sa forme galénique que par ses constituants. D'une façon générale, le véhicule a souvent très peu de possibilité de pénétrer, son action principale étant, en général, de moduler la capacité de pénétration des substances actives qu'il contient. Il est important de souligner que le choix d'une huile, par exemple dans une formulation, influe sur la capacité de pénétration des substances actives qu'elle renferme : pour obtenir une action de surface, une huile de nature hydrocarbonée comme les paraffines, la vaseline ou encore les silicones, qui ne pénètrent pas, sera préférée à des huiles de types végétales qui permettent une pénétration plus importante.

Entre ensuite en compte la forme finale du véhicule qui joue un rôle tout aussi important dans la pénétration ou non de la molécule qu'il contient. A titre d'exemple, une nanoémulsion aura davantage tendance à jouer un effet promoteur d'absorption qu'une émulsion multiple ou qu'un gel hydrophile, mais facilitera moins le transport des molécules au travers de la peau que l'utilisation de liposomes.

Ainsi, lorsqu'une substance est déposée sur la peau, elle peut traverser la couche cornée, diffuser à travers l'épiderme, le derme et l'hypoderme, et être résorbée dans les capillaires sanguins. Cette absorption percutanée est un phénomène de diffusion passive qui s'exerce au niveau de chacune des couches de la peau. Elle est modélisée par la première loi de Fick (présentée ci-dessous), énonçant que le flux percutané (J) de diffusion est proportionnel au gradient de concentration de part et d'autre de la membrane.

Plus la préparation présente sur la peau est concentrée en la substance d'intérêt, plus sa diffusion sera grande. Lorsque la saturation du véhicule est atteinte, l'activité thermodynamique est maximale. Ce flux est également régulé par le coefficient de partage (K_m) entre le véhicule de cette molécule d'intérêt et la couche cornée. Plus cette valeur est élevée, plus la substance aura une forte affinité pour la couche cornée, et plus sa diffusion passive sera importante. L'épaisseur de la couche cornée (e) est bien évidemment aussi

prise en compte : plus elle est importante, plus le flux sera faible. Cette équation permet de prendre également en compte d'autres facteurs tels que : i) le coefficient de diffusion du composé dans la couche cornée (D), qui traduit la mobilité de la substance diffusante à travers celle-ci : plus la molécule est complexe, plus la diffusion est faible ; ii) le coefficient de perméabilité (Kp), traduisant la vitesse de diffusion, qui dépend uniquement des caractéristiques du soluté et de la membrane (Martini 2006).

Première loi de Fick :

$$J = \frac{Km \times D \times \Delta c}{e} = Kp \times \Delta c$$

$$D = \frac{e^2}{6T_L}$$

J = flux percutané ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)

Kp = coefficient de perméabilité ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$)

Δc = différence des concentrations de part et d'autre de la membrane ($C_1 - C_2$)

Km = coefficient de partage couche cornée / véhicule

D = coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)

e = épaisseur de la couche cornée en μm

T_L = temps de latence

La vitesse de diffusion transcutanée est donc fonction de plusieurs paramètres qu'il est nécessaire de prendre en compte afin de mieux appréhender ce mécanisme. D'autres facteurs que ceux énoncés précédemment peuvent également avoir une influence sur la perméation cutanée, comme le site anatomique étudié où l'épaisseur de la peau sera variable, mais également selon l'espèce prise en compte. C'est pourquoi nous nous attarderons dans le paragraphe suivant sur les différents modèles de diffusion transdermique couramment utilisés et leur fiabilité de prédiction.

3.2. Modèles d'étude de la diffusion transdermique

Le choix d'une approche expérimentale et d'un modèle cutané pour l'étude de l'absorption d'une molécule est une étape indispensable lors de la mise au point d'une forme galénique topique. Plusieurs approches sont alors possibles : l'approche *ex vivo*, au moyen d'explants cutanés d'origine animale ou humaine, l'approche *in vitro*, utilisant des modèles de peaux reconstruites, et enfin l'approche *in vivo*, menée directement chez l'animal ou chez l'homme.

D'une façon générale, l'utilisation de membranes liquides a été envisagée mais n'a pas été retenue dans le cadre des études de diffusion, du fait de sa simplicité structurale ne permettant pas de fournir un modèle de diffusion transcutanée adéquat (Houk & Guy 1988). Les systèmes polymériques ont également été considérés, le système le plus simple étant les membranes silicones. Dans certaines conditions, il est possible d'obtenir une corrélation entre le transfert au travers de ces membranes et de la peau. Le tissu le plus fiable, et par ailleurs le plus utilisé, reste cependant celui provenant directement des animaux, malgré les problèmes éthiques que cela peut engendrer. Enfin, afin de limiter au maximum l'utilisation de peaux animales, l'utilisation de peaux obtenues directement par culture tend à se développer. Cependant, ces dernières ont des fonctions barrières plus limitées que les tissus provenant notamment d'oreilles de porc (Hadgraft 2004). Ces différentes techniques expérimentales et leurs limites vont être présentées dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Modèles ex vivo

3.2.1.1. Cellules de diffusion de Franz

La plus répandue des approches expérimentales permettant l'étude de l'absorption cutanée d'une substance est l'utilisation de cellules de diffusion de Franz. Elle consiste en l'emploi d'explants cutanés d'origine humaine ou animale, ou encore d'explants développés *in vitro*, montés sur des cellules de diffusion (Franz 1975). L'explant de peau délimite alors deux compartiments : un compartiment donneur, ou épidermique, recevant la substance à étudier, et un compartiment receveur, ou dermique, contenant un milieu receveur thermostaté permettant le maintien de l'intégrité de la peau. La quantité de substance diffusée au cours du temps au travers de l'explant est alors dosée après échantillonnage du milieu receveur. Il est important de noter que ces prélèvements ne sont pas invasifs et n'altèrent en rien la qualité des peaux utilisées (Howes *et al.* 1996).

Deux types de cellules de Franz existent : les cellules dites statiques, où le volume du milieu receveur est fixe, et les cellules dynamiques, appelées aussi cellules à flux continu, dans lesquelles le milieu receveur est constamment renouvelé. Les cellules peuvent être orientées verticalement ou horizontalement.

Les cellules statiques, utilisées dans le cadre de nos expérimentations, permettent une mise en œuvre plus aisée. Le volume fixe du compartiment receveur provoque cependant une accumulation de la substance diffusée, qui est à prendre en compte lors des dosages. L'inconvénient de ce type de cellules est qu'elles peuvent parfois conduire à un phénomène de saturation, entraînant une disparition du gradient de concentration, provoquant alors l'arrêt de l'absorption cutanée.

A l'inverse, les cellules dynamiques permettent de s'affranchir de cette accumulation par renouvellement du milieu receveur. Cependant, cela va induire une dilution plus importante de la substance diffusée, et ainsi nécessiter l'emploi de techniques de détection plus sensibles.

Enfin, dans le cas de l'utilisation de cellules verticales, les compartiments donneurs et receveurs sont remplis tout au long de l'étude de diffusion. Cela peut provoquer une hydratation excessive de la couche cornée causée par l'effet occlusif dû au remplissage du compartiment donneur, et ainsi altérer l'explant de peau. Ce système est donc moins adapté à la mesure de l'absorption cutanée et sera plutôt utilisé dans le cadre de mesure de flux et de coefficients de partage et de diffusion (OECD/OCDE-428 2004).

Le choix du liquide receveur doit être de préférence compatible avec les éléments physiologiques et respecter l'intégrité de l'explant de peau utilisé, mais il doit également prendre en compte les propriétés physico-chimiques de la substance à étudier afin d'en assurer la bonne solubilité après sa diffusion transcutanée (OECD/OCDE-428 2004). Afin d'éviter tout phénomène de saturation, il est recommandé que la concentration en substance diffusée dans le compartiment receveur soit dix fois inférieure à sa limite de solubilité. Les conditions de passage ainsi obtenues sont appelées conditions « sink ».

Le milieu receveur ne doit pas être un frein au passage transcutané de la substance. C'est pourquoi un agent solubilisant, tel que l'albumine de sérum bovin, peut être ajouté au milieu, ou encore des surfactants ou solvants organiques, tout en maintenant les conditions « sink » (Bronaugh *et al.* 1999, Challapalli & Stinchcomb 2002).

La température ayant également une influence sur la diffusion transcutanée passive des produits chimiques, il est important que les cellules de diffusion permettent le maintien des explants de peau à une température constante proche de la température physiologique externe de la peau, soit 32 ± 1 °C (OECD/OCDE-428 2004). Enfin, le pH du milieu receveur doit être aussi proche que possible de celui du sang, qui est de 7,4. Une agitation continue du fluide receveur doit également être maintenue afin d'assurer une bonne homogénéité du système (SCCS 2010).

3.2.1.2. Explants de peaux montés en cellule de diffusion de Franz

Les explants de peau utilisés peuvent être indifféremment d'origine humaine, provenant d'opérations chirurgicales (abdominoplasties ou mammoplasties), ou animale. Bien que l'utilisation de peau humaine soit préconisée car elle permet l'obtention de résultats plus significatifs qu'après utilisation de peau animale (Cronin *et al.* 1999, Levin & Maibach 2005), il est reconnu que son emploi dépend d'une part des disponibilités parfois limitées, mais aussi de considérations et conditions d'ordre éthique (OECD/OCDE-428 2004). De plus, il existe une grande variabilité de perméabilité d'un individu à l'autre, et d'un site anatomique à l'autre. Etant donné la difficulté de travailler directement sur de la peau humaine, beaucoup de ces études de diffusion transcutanée sont donc menées sur d'autres types d'explants, servant de substituts.

C'est pourquoi, malgré les préoccupations éthiques dues à l'emploi de modèle animal, l'usage en cellule de diffusion de Franz d'explants de peau prélevés chez les animaux est plus répandu (Godin & Touitou 2007).

Ces modèles, généralement plus disponibles que la peau humaine, permettent d'obtenir des valeurs de perméabilité d'un même ordre de grandeur que celles obtenues avec de la peau humaine, selon le composé d'intérêt et le véhicule utilisé (Bronaugh *et al.* 1982a,b). Cependant, la peau animale est en règle générale plus perméable que celle de l'homme.

En raison du grand nombre d'espèces décrites dans la littérature, il peut parfois être difficile de comparer des données de passage dermique ou transdermique. Aussi, des études ont permis de classer les modèles de peau en fonction de leur capacité à représenter la perméabilité de la peau humaine. Il en ressort que la peau des rongeurs, deux à trois fois plus fine que la peau humaine, n'apparaît pas être le modèle expérimental *ex vivo* le plus adapté en vue d'une extrapolation à l'homme (Tableau 3) (Morimoto *et al.* 1992), bien que ces derniers, notamment le rat, soient très souvent utilisés pour les études *in vivo*.

Les peaux représentant le mieux celle de l'homme sont celles provenant de primates et d'oreilles de porc (Bartek *et al.* 1972, Howes *et al.* 1996). Ces dernières sont par ailleurs les plus utilisées en tant que modèles *ex vivo* (Simon & Maibach 2000) car elles sont plus aisément accessibles en abattoirs. Pour les autres espèces, le manque de corrélation du passage transcutané de molécules avec la peau humaine s'explique par (Godin & Touitou 2007) :

- La variabilité de l'épaisseur de la peau et plus particulièrement de la couche cornée,
- La composition lipidique intracellulaire de cette dernière,
- Le nombre de strates présentes dans la structure cutanée.

Tableau 3 : Epaisseur de la peau, de l'épiderme et de la couche cornée en fonction de l'espèce considérée (Godin & Touitou 2007, Haigh & Smith 1994, Jacobi *et al.* 2007)

Espèce	Homme	Porc	Rat	Souris
Peau entière (mm)	3,0	3,4	0,9 - 2,8	0,7 - 0,8
Epiderme (µm)	70 (épaule)	60 - 85	30 - 62	29
Couche cornée (µm)	17	17 - 28	13 - 35	9
Poils par cm ²	14 - 32 (excepté au niveau du crâne)	20	ND	ND

ND : non disponible

Une fois la peau fraîchement excisée, celle-ci doit être utilisée dans les 24 heures. Elle peut également être conservée au maximum un an jusqu'à -20 °C sans modification apparente de sa perméabilité (Bronaugh *et al.* 1986). Dans tous les cas, il est essentiel que la peau soit correctement préparée, car toute manipulation inappropriée peut endommager la couche cornée et induire alors un biais expérimental. C'est la raison pour laquelle avant utilisation, il convient de contrôler l'intégrité de la couche cornée. Pour cela, plusieurs méthodes existent, dont notamment la mesure de la perte insensible en eau (PIE ou TEWL). Elle permet dans la majorité des cas d'établir une corrélation entre la fonction barrière assurée par une couche cornée

intacte, directement en relation avec l'absorption percutanée, et sa PIE (Levin & Maibach 2005). En effet, plus l'état de la peau se dégrade, plus sa PIE augmente (Tableau 4). D'autres méthodes permettent également de contrôler l'intégrité de la peau, comme l'étude du passage percutané d'une substance de référence ou encore la mesure de la résistance électrique de la peau (SCCS 2010).

Tableau 4 : Etat de la peau en fonction de la perte insensible en eau
(Source : Tewameter®)

Perte insensible en eau ($\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$)	Etat de la peau
0 - 10	Très bon
10 - 15	Bon
15 - 25	Normal
25 - 30	Mauvais
> 30	Critique

3.2.2. Modèles *in vitro*

L'approche expérimentale *in vitro* permettant de mesurer l'absorption cutanée est basée sur l'utilisation de membranes synthétiques (Clément *et al.* 2000, Dias *et al.* 1999, Feldstein *et al.* 1998, Geinoz *et al.* 2002, Shah *et al.* 1989) ou de peaux reconstituées/cultivées (Netzlaff *et al.* 2007, Rheinwald & Green 1975, Zhang & Michniak-Kohn 2012), montées également en cellules de diffusion de Franz.

La conception *in vitro* d'épiderme et/ou de couches dermiques, d'abord mise au point pour les greffes de grands brûlés, est actuellement très avancée, et peut permettre l'évaluation de la perméation de composés au travers d'un épiderme humain (Schäfer-Korting *et al.* 2008). Un certain nombre de tissus cutanés provenant de cultures tels que des modèles équivalents de peaux vivantes (LSEs) et des épidermes humains reconstitués (RHE en anglais) ont en effet été utilisés pour mesurer l'absorption percutanée de composés. Ces techniques consistent généralement à reconstruire un tissu cutané (derme, épiderme ou ensemble dermo-épidermique) à partir de cellules humaines en culture et d'éléments matriciels normalement présents dans la peau, qui est utilisé comme alternative aux peaux animales.

Les LSEs ressemblent à de la peau humaine avec un derme, un épiderme et une couche cornée partiellement différenciée, mais sont déficients en appendices tels que les glandes pilo-sébacées, les follicules pileux et les glandes sudoripares. Ces tissus fournissent des propriétés de barrière beaucoup plus faibles que l'ensemble de la peau en raison de leur structure et de leur composition lipidique. Pour cette raison, les cinétiques de perméation obtenues au travers de ces modèles sont généralement fortement surestimées par rapport à celles obtenues au travers d'une peau humaine.

Les épidermes humains reconstitués sont quant à eux comparables à de la peau humaine. Il en existe actuellement plusieurs modèles (Episkin®, SkinEthic®, Mimeskin®, Phenion® Full Thickness Skin Model, Epiderm FT®, etc.), développées par différents laboratoires dans le monde tels que Phenion, Mat Teck Corporation ou encore L'Oréal.

L'emploi de ces modèles de peaux reconstituées est recommandé pour l'évaluation de l'irritation cutanée de matières premières et de produits finis (Welss *et al.* 2004). Cependant, l'utilisation de cultures de peaux dans le cadre d'études de perméation est susceptible d'être limitée en raison, d'une part, de la surestimation de la perméabilité du composé au travers de ces modèles, du fait de leurs propriétés barrières moins importantes qu'une peau issue du vivant et, d'autre part, de leur coût élevé et de la courte durée de vie de ces modèles *in vitro* (Godin & Touitou 2007, Groeber *et al.* 2011, Zhang & Michniak-Kohn 2012).

D'une façon générale, l'utilisation de modèles de peau montée en cellules de Franz est un outil important permettant d'effectuer un certain nombre d'études relativement approfondies de la diffusion transcutanée d'une substance. Bien que ces études soient dépendantes de nombreux facteurs tels que le type de cellules de diffusion et les modèles d'explants utilisés, ou encore le choix des conditions expérimentales selon les propriétés physico-chimiques du composé à étudier (Godin & Touitou 2007), ces dernières sont assez bien contrôlées. En effet, lors de ces essais, seuls les explants employés et les substances testées varient (Brain *et al.* 2002).

Alors que les expérimentations *in vitro* et *ex vivo* d'absorption percutanée conviennent dans de nombreux cas, elles présentent toutefois des limites. En effet, ces études ont un inconvénient principal : elles ne reflètent en aucun cas la résorption sanguine des composés étudiés. De plus, la pertinence de ces méthodes peut être discutée lors de l'évaluation du passage transcutané de substances lipophiles, dont l'absorption sera moindre lors d'études *in vitro* qu'elle ne l'est *in vivo*. Par conséquent, ces techniques *in vitro* et *ex vivo*, même si elles sont réalisées sur peaux humaines, ne peuvent remplacer à l'heure actuelle les méthodes *in vivo* chez des animaux qui, jusqu'à présent, sont les seuls modèles permettant d'apprécier à la fois la pénétration systémique d'un composé et sa toxicité associée (Tymen *et al.* 2000a).

3.2.3. Modèles *in vivo*

In vivo, les méthodes d'évaluation de l'absorption cutanée sont réalisées le plus couramment sur différentes espèces d'animaux de laboratoires, mais parfois également directement chez l'homme. Chez ce dernier, l'étude de l'absorption est limitée aux produits non toxiques. Elle est étroitement réglementée par la Déclaration d'Helsinki de 2013 (Assemblée générale de l'association Médicale Mondiale 2013). L'utilisation de radioéléments chez l'homme est par ailleurs réglementée par la Commission Internationale de Protection Radiologique, la CIPR.

Chez les animaux de laboratoire, l'espèce la plus communément utilisée est le rat, bien que des études soient également menées chez le lapin, ou encore le cobaye, le porc et le singe, ces derniers ayant une peau se rapprochant davantage de celle de l'homme (Bartek *et al.* 1972). Les avantages de l'utilisation de rongeurs résident dans leur petite taille, leur manipulation aisée et leur coût relativement faible. Contrairement aux études en cellules de Franz décrites précédemment, les études sur animaux permettent l'utilisation d'un système intact sur le plan physiologique et métabolique. En revanche, l'inconvénient de ces modèles, outre les critères économiques, techniques et éthiques, consiste en la différence de perméabilité entre la peau humaine et celles des espèces utilisées. En effet, une fois encore, la peau animale est en général plus perméable, notamment celle du rat (Ravenzwaay & Leibold 2004), et peut conduire à une surestimation de l'absorption percutanée chez l'homme (Bartek *et al.* 1972, OECD/OCDE-427 2004).

Le principe de ces études de diffusion transdermique consiste à appliquer une quantité connue de la substance à étudier sur une surface déterminée de la peau de l'animal. Les animaux sont ensuite placés en cage à métabolisme pendant la durée de l'expérimentation, afin de recueillir à des temps définis les excréta (urines et fèces). Ces échantillons sont alors analysés afin d'y déterminer la quantité de substance présente, et ainsi en déduire l'élimination de la substance par l'organisme, et, de façon indirecte, sa diffusion transdermique. Ces informations peuvent être complétées par le dosage de la molécule cible dans les fluides biologiques, ainsi que dans différents tissus et organes de l'animal après euthanasie. De nombreuses méthodes permettent de quantifier l'absorption percutanée du composé étudié, mais en raison des très faibles quantités généralement absorbées par la peau, beaucoup d'auteurs ont recours à l'emploi de molécules radiomarquées. Cette méthode est également recommandée par l'OCDE (OECD/OCDE-427 2004), la substance à tester étant radiomarquée de préférence sur une position métaboliquement stable. Le cas particulier du suivi d'un élément radioactif tel que l'uranium au travers de la peau permet de s'affranchir de cette étape de radiomarquage.

L'étude de la diffusion transcutanée de composés par ces différentes approches expérimentales a également été menée dans le secteur nucléaire, en particulier pour le suivi du passage au travers de la peau de radionucléides en cas de contamination cutanée tel que l'uranium, comme cela sera présenté dans les paragraphes suivants.

3.3. Contamination cutanée par l'uranium

Une contamination cutanée à l'uranium peut survenir sur peaux intactes, dans ce cas le composé ne traversera pas facilement la barrière épidermique. Cependant, ce passage peut être fortement augmenté lors de contaminations survenant sur des peaux lésées (Griffiths *et al.* 2012). Ces lésions cutanées peuvent être initialement présentes, ou être induites directement par le mode de contamination. Il est alors

possible que la peau présente des lésions profondes ou superficielles telles que des piqûres, lacérations, incisions ou encore abrasions causées par des outils ou des machines (Bailey *et al.* 2003, Blanchin *et al.* 2004, Petitot 2010). Elles peuvent également se matérialiser par des brûlures chimiques (attaques acide ou alcaline) (Bérard *et al.* 1994b) ou thermiques (jet de vapeur ou par contact). De plus, l'entrée de radionucléides au travers d'une blessure ouverte dans le cas d'une attaque au moyen d'un dispositif de dispersion radiologique ou « bombe sale » peut conduire à une importante contamination radioactive pour le personnel militaire ou les civils.

Tous ces types de lésions sont alors, à différents degrés, le résultat d'une perte de la fonction barrière de la peau, pouvant induire un passage accru des composés contaminants au travers des différentes strates cutanées et dans la circulation sanguine, conduisant finalement à leur accumulation au niveau de sites de rétention. Les zones corporelles principalement exposées sont les mains, les membres supérieurs, inférieurs ou encore la tête (Bérard *et al.* 2010, Petitot 2010).

Aussi les chapitres suivants s'attacheront à présenter dans un premier temps les principales études réalisées sur l'absorption cutanée de l'uranium, que ce soit sur peaux intactes ou lésées. Elles permettront ainsi de déterminer le temps disponible pour traiter ces contaminations cutanées avant que le passage de l'uranium dans le sang ne soit significatif, et d'évaluer les conséquences d'une décontamination incomplète. Les traitements actuellement employés en cas de contamination cutanée par l'uranium seront présentés, et enfin les travaux portant sur le développement de traitements d'urgence seront discutés.

3.3.1. Peau intacte

La peau étant considérée par la Commission Internationale de Protection Radiologique comme une source d'incorporation potentielle des actinides (Taylor *et al.* 1986), il s'est avéré important d'étudier de manière plus approfondie le profil de pénétration de ces derniers.

C'est pourquoi de nombreux travaux se sont attachés à décrire l'absorption percutanée de l'uranium, c'est-à-dire son transfert au travers de la peau, depuis le milieu extérieur jusqu'au sang. Ces expérimentations ont essentiellement pour objectif d'évaluer l'affinité du radiocontaminant pour la couche cornée et d'établir un profil de pénétration cutanée, afin d'appréhender la part de radionucléides susceptible d'atteindre la circulation sanguine et par conséquent, les tissus cibles. L'ensemble des travaux portant sur ce sujet vont maintenant être présentés et sont résumés dans le [tableau 5](#).

3.3.1.1. Profil de pénétration de l'uranium

L'étude du mécanisme et de la cinétique de diffusion de l'uranium, dans et au travers des structures cutanées, a été menée à la fois par des méthodes *ex vivo* et *in vivo*. Il en ressort qu'après contamination par du nitrate d'uranyle sur peau intacte d'oreille de porc montée en cellules de Franz, une accumulation

d'uranium au niveau de la strate la plus externe de la couche cornée est observée (Spagnul *et al.* 2011). Lors de travaux réalisés sur des explants de peau humaine abdominale et de peau dorsale de rat, contaminées encore une fois par du nitrate d'uranyle, la radioactivité a été retrouvée en grande partie dans l'épiderme, et 2 à 4 % de la quantité déposée se situait dans le derme. Cette radioactivité était concentrée majoritairement dans et autour des poils et des glandes sébacées (Tymen *et al.* 2000a).

Ces études viennent confirmer celles menées précédemment par De Rey *et al.* en 1983 (De Rey *et al.* 1983) sur des rats Wistar contaminés par différents composés d'uranium tels que du nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$), soluble, du tricarbonat d'uranyle ($(\text{NH}_4)_4\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$ soluble, du diuranate d'ammonium (yellow cake, $\text{U}_2\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$) moyennement soluble, de l'acétate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$) moyennement soluble, et enfin du dioxyde d'uranium (UO_2) faiblement soluble. En effet, une heure après contamination, la quantité de nitrate d'uranyle stockée dans l'épiderme est plus importante que celle contenue dans le derme, données également retrouvées lors des expérimentations de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007b).

Après étude microscopique de la diffusion de l'uranium, De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) ont démontré que 15 min seulement après la contamination par du nitrate d'uranyle, le stockage de ce dernier dans l'épiderme se fait essentiellement au niveau des espaces intercellulaires, entre la couche cornée et la couche granulaire ainsi qu'autour des poils et des annexes pilo-sébacées. Il est important de noter l'emploi d'une émulsion huile dans eau (H/E) comme véhicule des divers composés testés, très certainement dans le but d'en augmenter leur solubilité. Cela a cependant pu avoir une incidence sur la pénétration cutanée de l'uranium.

Selon ces mêmes études, 24 h après contamination, des traces d'uranium sont observées dans certains capillaires sanguins de cellules endothéliales du derme supérieur, témoignant ainsi de l'entrée de l'uranium dans la circulation sanguine. De plus, aucune pénétration cutanée des autres composés d'uranium n'a été observée avec les techniques employées, et ce, même après des contaminations répétées. Selon les études de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007b), ce phénomène de résorption de l'uranium dans la circulation sanguine paraît survenir bien plus rapidement, puisque 30 minutes seulement après contamination de rats sans poils *hairless* par du nitrate d'uranyle ou après une contamination sous forme de poudre, l'uranium apparaît dans le derme. Ce dernier étant une structure très richement vascularisée, la pénétration de l'uranium dans la circulation sanguine aurait ainsi pu se produire bien plus tôt que le délai de 24 h. Il est aussi fortement probable que l'entrée initiale de l'uranium dans le compartiment sanguin n'ait pu être mise en évidence lors de ces études du fait de la forte dilution du radioélément dans celui-ci, rendant sa détection difficile.

Bien que l'incorporation de l'uranium au travers d'une peau intacte demeure faible puisque qu'elle n'est détectée que 3 à 4 h après contamination en cellules de Franz au travers respectivement d'explants de

peau de rat sans poils (*hairless*) et de peau d'oreille de porc (Petitot *et al.* 2004), et 24 h après contamination dans les urines de rats contaminés (Petitot *et al.* 2007a), ses effets toxiques ne sont pas à négliger. En effet, l'ensemble des études précédemment citées montrent que l'épiderme constitue un réservoir pour l'uranium, qui pourra par la suite diffuser lentement vers le derme jusqu'au compartiment systémique, entraînant d'une part une exposition prolongée des cellules souches de la peau au radionucléide, mais également sa distribution et rétention dans ses organes cibles (§ 2.2 Biocinétique de l'uranium).

3.3.1.2. Facteurs d'influence de l'absorption percutanée de l'uranium

L'absorption de l'uranium au travers de la peau dépend de plusieurs facteurs. En effet, un des facteurs limitant le passage de ce radionucléide dans les différentes strates cutanées réside dans la forme physico-chimique du composé contaminant, comme le montre notamment les études de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a) et de De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) : l'uranium sous sa forme transférable (nitrate d'uranyle) peut franchir la couche cornée en 15 min seulement et diffuser ensuite par voie intercellulaire dans le derme, pour se retrouver dans la circulation sanguine 30 min après contamination sur peau intacte, alors qu'aucune pénétration cutanée des autres composés d'uranium n'est observée.

L'influence non négligeable de l'espèce utilisée pour les études d'absorption est également à prendre en compte lors de l'évaluation du passage transcutané de l'uranium. Après comparaison de résultats obtenus suite à une contamination par du nitrate d'uranyle de peaux de rat sans poils ou de peaux humaines montées en cellules de Franz (Tymen *et al.* 2000a), il apparaît que la diffusion de l'uranium au travers de la peau de rat est 10 fois plus importante qu'au travers d'une peau humaine, avec respectivement environ 0,2 % et 0,04 % d'uranium récupéré dans les fluides receveurs. Ces études confirment celles de Bartek *et al.* (Bartek *et al.* 1972) qui ont permis d'observer une différence similaires, entraînant une surestimation de la diffusion percutanée. Néanmoins, la distribution de l'uranium entre l'épiderme et le derme reste inchangée quelle que soit l'espèce concernée (rat ou homme), avec une très grande majorité de l'élément répartie dans l'épiderme (Tymen *et al.* 2000a).

3.3.1.3. Toxicité

Bien que l'absorption percutanée de l'uranium soit faible au travers d'une peau intacte, des manifestations de sa toxicité suite à ce type de contamination ont été observées. En effet, deux jours après contamination de rats par dépôt de 30 à 420 mg de nitrate d'uranyle sur une zone dorsale (De Rey *et al.* 1983), des dommages sont apparus au niveau des tissus cutanées. Il a notamment été observé un détachement de la couche cornée, la présence d'un exsudat purulent abondant à la surface épidermique, une migration de cellules du système immunitaire au travers de l'épiderme, un gonflement des cellules dans les couches

basale et épineuse, un élargissement de la zone intercellulaire, et enfin une hypertrophie des follicules pileux et des glandes sébacées correspondantes.

De surcroît, au-delà de la toxicité localisée au niveau cutanée, une application quotidienne de nitrate d'uranyle ou de tricarbonat d'uranyle $((\text{NH}_4)_4\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3)$ (composés solubles) pendant 5 jours a provoqué le décès de tous les rats suite à une importante toxicité rénale. Après contamination quotidienne des animaux par des composés moyennement ou faiblement solubles tels que le diuranate d'ammonium (yellow cake, $\text{U}_2\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$) et l'acétate d'uranyle $(\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2)$, une perte de poids transitoire disparaissant à l'arrêt de la contamination ainsi que la mort de certains rats ont été observées, bien que les analyses des peaux et du sang de ces derniers n'aient pas révélé la présence d'uranium. Ces observations soutiendraient l'hypothèse que la limite de détection de l'uranium trop élevée ne permette pas l'analyse de faibles quantités d'uranium lors de ces études. Aucune perte de poids ni décès n'a été observé après contamination des animaux par de l'uranium faiblement soluble sous forme d' UO_2 . D'autres études ont permis de constater qu'un contact prolongé de la peau avec de l'uranium provoquait un amincissement irréversible de l'épiderme associé à une augmentation de la perméabilité de la peau (Ubios *et al.* 1997). En effet, après avoir contaminé *in vivo* de façon chronique (30 jours) la peau dorsale rasée de rats par une forte quantité d'uranium peu soluble (12 mg d'oxyde d'uranium U_3O_8) mais véhiculé par une émulsion H/E, une importante augmentation de la perméabilité cutanée ainsi qu'une diminution significative de l'épaisseur de l'épiderme (de $41 \pm 14 \mu\text{m}$ à $21 \pm 10 \mu\text{m}$) ont été observées. Ces altérations de perméabilité ont été conservées 60 jours après l'arrêt des contaminations, et une faible récupération au niveau de la structure de l'épaisseur de l'épiderme (14 %) a été observée.

Enfin, des études *in vivo* ayant pour objectif d'évaluer l'influence de l'aire de peau exposée ainsi que du temps de contamination sur l'absorption cutanée de l'uranium ont été menées (Lopez *et al.* 2000). Elles ont permis, après contamination cutanée quotidienne pendant 4 jours d'une peau dépilée de rats par du nitrate d'uranyle (véhiculé par une émulsion H/E), de mettre en évidence une toxicité rénale allant parfois jusqu'au décès des animaux. Cette toxicité et le taux de mortalité ont été d'autant plus importants que le temps de contamination quotidien ou la surface d'exposition cutanée étaient élevés, atteignant 100 % de mortalité après application de nitrate d'uranyle sur une surface cutanée de 8 cm^2 ou après un temps d'exposition de 24 h. Au terme des 4 jours de contamination, des altérations osseuses et rénales ont également été mises en évidence avec notamment une diminution du volume osseux d'autant plus importante que l'aire cutanée exposée augmentait. Il a cependant été remarqué qu'un lavage de la zone contaminée par de l'eau savonneuse permettait de réduire la létalité mais ne permettait pas de prévenir pour autant les dommages rénaux.

Ainsi, bien que le passage de l'uranium au travers d'une peau intacte soit faible et lent, son incorporation peut être suffisamment importante, notamment en cas de contact prolongé ou répété, ou selon

l'étendue de la zone contaminée, pour qu'apparaissent des effets toxiques. Même si la couche cornée constitue une excellente barrière de protection contre l'incorporation de substances exogènes, elle joue également un rôle important de réservoir pour les formes plus ou moins solubles de l'uranium, qui pourront ensuite diffuser vers les strates inférieures de la peau jusqu'à leur résorption dans la circulation sanguine. De plus, l'uranium peut aussi diffuser par des voies plus rapides telles que les follicules pileux, les glandes sudoripares ou encore les glandes sébacées. Les accidents de contamination cutanée par l'uranium ne sont donc pas à négliger, puisqu'ils peuvent conduire à une exposition interne. Se pose alors la question de l'influence de lésions cutanées sur l'absorption de l'uranium, celles-ci induisant inévitablement des modifications des propriétés de barrière de la peau.

Tableau 5 : Absorption cutanée de l'uranium au travers de peaux intactes

Objectif de l'étude	Modèle de l'étude	Contamination cutanée par l'uranium						Résultats	Référence bibliographique
		Composé de U	Quantité de U	Volume déposé	Aire cutanée contaminée	Epaisseur de la peau	Durée		
Localisation de U dans les structures cutanées	<i>In vivo</i> (rat Wistar) : Peau dorsale	UO ₂ (NO ₃) ₂ (NH ₄) ₄ UO ₂ (CO ₃) ₃ U ₂ O ₇ (NH ₄) ₂ UO ₂ (CH ₃ COO) ₂ UO ₂ (émulsion H/E)	30 à 420 mg	1 mL	3 cm ²	-	1 fois/j 10 j	<p>* UO₂(NO₃)₂ :</p> <ul style="list-style-type: none"> - U traverse la couche cornée en 15 min par la voie intercellulaire - U dans les capillaires sanguins du haut du derme après 24 h - Mort de tous les rats contaminés en 5 j <p>* Autres composés :</p> <p>Pas de pénétration significative de U dans la peau mais toxicité parfois constatée</p>	De Rey <i>et al.</i> 1983
Cinétique de diffusion percutanée de U	<i>Ex vivo</i> : -Peau dorsale de rat <i>hairless</i> - Peau abdominale humaine	Solution de UO ₂ (NO ₃) ₂ pH 1	1 µg (360 Bq en ²³³ U)	100 µL	1,4 cm ²	Peau entière	2 h	<ul style="list-style-type: none"> - Validation de l'emploi de cellules de Franz pour l'étude de l'absorption cutanée de U - Couche cornée : bonne barrière cutanée - Peau de rat : surestimation du passage percutané de U par rapport à une peau humaine 	Tymen <i>et al.</i> 2000a
	<i>In vivo</i> (rat <i>hairless</i>): Peau dorsale					-			
Cinétique de diffusion percutanée de U	<i>Ex vivo</i> : Peau dorsale de rat <i>hairless</i>	Solution de UO ₂ (NO ₃) ₂ pH 1	1,4 µg (500 Bq en ²³³ U)	100 µL	1,77 cm ²	Peaux entières : 1,50 mm	24 h	<p>Sur peau entière :</p> <ul style="list-style-type: none"> - U traverse en 3 à 4 h - Faible diffusion percutanée de U - U essentiellement dans l'épiderme à 24 h - Couche cornée : bonne barrière cutanée 	Petitot <i>et al.</i> 2004
	Peau d'oreille de porc					1,34 mm			
Effets à long terme de la contamination cutanée par U sur la peau	<i>In vivo</i> (rat Wistar) : Peau dorsale rasée	Emulsion H/E U ₃ O ₈	12 mg	0,25 mL	15 cm ²	-	1 fois/j 30 j	<p>Contamination à long terme :</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↘ épaisseur de l'épiderme - ↘ perméabilité cutanée 	Ubios <i>et al.</i> 1997
Influence sur le passage percutané de U : - De l'aire de peau contaminée - Du temps de contamination	<i>In vivo</i> (rat Wistar) : Peau dorsale épilée	Emulsion H/E UO ₂ (NO ₃) ₂	600 mg	1 mL	0,5 à 16 cm ²	-	1 fois/j 4 j	<ul style="list-style-type: none"> - Mortalité ↗ quand la surface de peau contaminée et le temps de contact ↗ - Rinçage de la peau à l'eau savonneuse 15 min après la contamination permet la survie de 100 % des rats mais toxicité rénale subsiste 	Lopez <i>et al.</i> 2000
					8 cm ²		1 min à 24 h		
Influence de la forme chimique sous laquelle se trouve U sur sa cinétique de diffusion percutanée	<i>In vivo</i> (rat Wistar) : Peau dorsale rasée, conditions occlusives	Poudre de UO ₂ (NO ₃) ₂	2,844 mg	-	1,77 cm ²	-	24 h	<ul style="list-style-type: none"> - U dans le derme 30 min après contamination quelle que soit sa forme chimique 	Petitot <i>et al.</i> 2007a,b
		Solution de UO ₂ (NO ₃) ₂ pH 1	474 µg	200 µL					
Cinétique de diffusion percutanée de U	<i>Ex vivo</i> : Peau d'oreille de porc	Solution de nitrate d'uranyle pH 5	6 µg	600 µL	1,76 cm ²	1,07 mm	24 h	<ul style="list-style-type: none"> - Faible diffusion percutanée de U - Accumulation de U sur la strate la plus externe de la couche cornée : effet barrière 	Spagnul <i>et al.</i> 2011

3.3.2. Peau présentant des lésions superficielles

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, une contamination cutanée par l'uranium peut survenir sur une peau lésée. Ce chapitre s'attachera donc à présenter les différentes études portant sur le comportement de l'uranium dans et au travers des peaux présentant tout d'abord des lésions superficielles telles que l'excoriation, des brûlures chimiques ou encore des écorchures. L'objectif de ces travaux est d'estimer l'exposition interne des individus soumis à ce type de contamination, afin par la suite d'adapter leur prise en charge.

3.3.2.1. Excoriation

Afin de mimer une peau excoriée, c'est-à-dire légèrement écorchée, la méthode dite de *tape stripping* est largement utilisée. Cette méthode consiste en l'application successive d'adhésifs sur la surface cutanée étudiée, permettant de retirer au fur et à mesure la totalité des différentes strates de la couche cornée. Ainsi de nombreux travaux ont été menés, dont notamment ceux de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2004), afin d'étudier l'effet de l'absence de la couche cornée sur le passage de l'uranium. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence une diffusion très largement accrue de l'uranium au travers d'une peau de rat excoriée et contaminée par du nitrate d'uranyle, montée en cellules de Franz, avec environ 78 % de l'uranium retrouvé dans le compartiment receveur 24 h après contamination contre environ 3 % après contamination sur peau intacte.

Lors d'expérimentations similaires menées cette fois sur des oreilles de porc (Spagnul *et al.* 2010b, 2011), environ 44 % de l'uranium déposé étaient retrouvés dans le compartiment receveur des cellules de Franz 24 h après contamination sur peaux excoriées, contre 0,03 % sur peau intacte. L'ensemble de ces études démontrent l'importance de la présence de la couche cornée, qui permet par son effet barrière de minimiser le passage de l'uranium au travers de la peau sur 24 h. Il est également intéressant de noter que ces études confirment que la peau de rat présente une plus grande perméabilité qu'une peau provenant d'oreille de porc.

En plus de conduire à une forte augmentation de la quantité d'uranium la traversant, une peau excoriée est également à l'origine d'une diminution du délai de pénétration de l'uranium dans l'organisme. En effet, le passage de celui-ci est significatif 30 min seulement après contamination d'explant de peaux de rats excoriées (Petitot *et al.* 2010). Ces résultats sont également confirmés par des études *in vivo* menées chez le rat *hairless* contaminé par du nitrate d'uranyle en solution ou en poudre (Petitot *et al.* 2007a,b), qui démontrent que l'incorporation d'uranium au travers de peaux d'animaux présentant une excoriation augmente considérablement. Après contamination aqueuse par une solution de nitrate d'uranyle, l'absorption percutanée devient significative dès 30 min après contamination, alors que le passage du radionucléide au travers d'une peau intacte n'est détecté que 6 h après contamination. Suite à une

exposition de 24 h, le pourcentage total d'uranium ayant traversé une peau excoriée est 11 fois plus élevé qu'au travers d'une peau intacte.

La diffusion percutanée de l'uranium dépend donc en grande partie de l'intégrité de la barrière cutanée avec une importance particulière de la présence de la couche cornée.

3.3.2.2. Brûlures chimiques ou thermiques

D'autres études se sont plus particulièrement intéressées au devenir de l'uranium après contaminations de peaux présentant des lésions superficielles induites par des brûlures chimiques, provoquées par une solution acide ou basique. En effet, les travaux de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a,b) ont consisté à évaluer l'influence de la présence de brûlures chimiques cutanées plus ou moins importantes sur le devenir de l'uranium dans et au travers de la peau après contamination. Les brûlures à l'acide ont été réalisées sur des rats *hairless* par l'utilisation d'acide nitrique (HNO_3) 2 N, 5 N, et 14 N, d'acide fluorhydrique (HF) 10 N, et les brûlures alcalines par de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 10 N. Le choix de ces solutions repose sur l'utilisation réelle de celles-ci au cours de certaines étapes du traitement du combustible. Il en ressort que la concentration en uranium dans l'épiderme dépend du type d'altération de la barrière cutanée provoquée par les brûlures. En effet, cette concentration augmente avec la concentration d'acide nitrique contenant la contamination, avec un maximum de rétention de l'uranium à ce niveau après contamination par de l'acide nitrique à 14 N (6 fois plus qu'au travers d'une peau intacte). Dans ce dernier cas de figure, la teneur en uranium dans le derme 30 min après exposition est environ 22 fois supérieure à celle obtenue après contamination sur peau intacte. Ainsi plus la solution de contamination est concentrée en acide nitrique, et plus l'uranium incorporé dans la peau reste au niveau du site du dépôt. Ce phénomène peut être expliqué par la formation d'un œdème dont l'importance augmente avec la sévérité de la brûlure.

Dans les cas de plus graves brûlures, les vaisseaux sanguins de la peau peuvent également être nécrosés et perdre leur capacité de transport. Cette nécrose est le résultat d'une déshydratation intracellulaire et d'une coagulation des protéines. L'uranium est dans ce cas piégé au niveau de la lésion, puisqu'après 6 h d'exposition, environ 99 % du contenu total de l'organisme en uranium y est retenu en cas de brûlures par de l'acide nitrique 14 N et 5 N, contre environ 70 % en cas de brûlures par de l'acide nitrique 2 N ainsi qu'après contamination sur peau intacte. L'incorporation de l'uranium suite à une brûlure chimique par une solution d'acide nitrique est alors retardée. Ces observations ont également été confirmées par des études menées *ex vivo* (Petitot *et al.* 2010).

Il a également été observé que la concentration dans l'épiderme après brûlure à l'hydroxyde de sodium 10 N était comparable à celle obtenue après contamination à l'acide nitrique 5 N. De plus, dès 30 min après contamination associée à une brûlure, les couches profondes de la peau (derme) présentent une

accumulation d'uranium, et sa concentration dans le muscle sous-jacent au site de dépôt est significativement supérieure au groupe non contaminé, et ce quel que soit le type de contamination. Cela n'est pas le cas lorsque l'exposition est réalisée sur peau intacte, où la concentration dans le muscle sous-jacent a une tendance à augmenter dès 30 min après exposition, mais devient significativement supérieure au groupe non contaminé après seulement 6 h d'exposition (Petitot *et al.* 2007b).

Cependant, l'épiderme brûlé peut jouer un rôle de réservoir d'uranium plus important que la peau intacte, retardant ainsi l'incorporation de l'uranium dans l'organisme. L'excrétion urinaire d'uranium ne devient alors significative que 6 h après contamination par de l'acide nitrique (Petitot *et al.* 2007a). Cela implique d'importantes conséquences dans le suivi radio-toxicologique des individus contaminés suite à ce type de brûlure puisque la quantification de l'uranium éliminé par voie urinaire sous-estimerait alors la quantité d'uranium réellement incorporée durant les premières heures suivant la contamination.

L'étude de l'influence du pH de la solution contaminée sur l'absorption percutanée a également été menée *in vivo* chez le rat, la blessure étant mimée par injection sous-cutanée de nitrate d'uranyle à pH 1 et pH 7 (Fukuda *et al.* 2009a). Les données de cette étude viennent confirmer celles de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a,b) citées ci-avant. En effet, indépendamment de la quantité injectée, la quantité d'uranium retenue au niveau du site d'injection 1 à 3 h après contamination est plus importante lorsque le pH de la solution de contamination est acide, avec environ 60 % de l'uranium injecté retenu, contre environ 35 % à pH 7. Tout comme lors des expérimentations précédentes (Petitot *et al.* 2007a,b), des altérations des tissus au niveau de la contamination ont été observées après contamination à pH 1 (Fukuda *et al.* 2009a). Le fait que l'uranium ne se trouve pas initialement sous la même forme chimique en fonction du pH de la solution contaminée peut également en partie expliquer ces résultats (§1.2, Figure 1).

D'autre part, il a été observé que 24 h après contamination par injection sous-cutanée, l'excrétion urinaire de l'uranium diminue lorsque le pH de la solution contaminée augmente, passant d'environ 3 % à 1,4 % après contamination à 16 mg.kg⁻¹ respectivement aux pH 1 et 7. Parallèlement, l'excrétion fécale de l'uranium à 24 h est plus importante à pH 7 (environ 27 %) qu'à pH 1 (environ 4 %), quelle que soit la concentration de la solution administrée. Il semble donc que ces phénomènes dépendent de la forme physico-chimique de l'uranium selon le pH, et que l'excrétion fécale augmente lorsque la quantité d'uranium entrée dans le sérum dépasse la capacité de filtration des reins. L'excrétion par voie fécale *via* le foie serait alors plus efficace que la voie urinaire. Enfin, quels que soient la concentration et le pH de la solution de contamination, la toxicité de l'uranium se manifeste chez les rats par des dommages rénaux sévères pouvant aller jusqu'à la nécrose des tissus (Fukuda *et al.* 2009a).

L'incorporation de l'uranium suite à une contamination cutanée par brûlure chimique paraît donc difficile à estimer puisqu'elle varie en fonction de la gravité de la brûlure, faisant également varier la rétention de

l'uranium dans les tissus cutanés. Une tendance générale peut tout de même se dégager au vu de l'ensemble des données obtenues, permettant le classement en ordre croissant des différents modèles de lésions superficielles cités auparavant selon la vitesse d'incorporation de l'uranium au niveau cutané :

peau intacte = 2 N HNO₃ = 10 N HF < 5 N HNO₃ < 10 N NaOH < 14 N HNO₃ << peau excoriée.

Un classement selon la vitesse de translocation de l'uranium du site de dépôt vers les organes cibles donnerait :

14 N HNO₃ < 10 N NaOH < peau intacte < 5 N HNO₃ << 2 N HNO₃ < 10 N HF < peau excoriée.

3.3.2.3. Ecorchures

Un dernier modèle de lésions superficielles a été étudié : l'écorchure réalisée au moyen d'une lame de rasoir sur le dos de souris *in vivo*, sur environ 1 cm², contaminée par une solution de nitrate d'uranyle contenant 150 mg d'uranium (Xu *et al.* 2008). 10 jours après contamination, 58 % des souris contaminées n'ont pas survécu, et les rescapées ont subi une perte de leur masse corporelle de 30 %. D'une manière générale, la majorité de l'uranium déposé a été retrouvée dans les reins des rongeurs. Lors de cette étude, la reproductibilité des écorchures réalisée est discutable en l'absence d'outils permettant un calibrage précis de la pression exercée.

L'ensemble des travaux menés sur des lésions cutanées superficielles *ex vivo* et *in vivo*, résumés dans le [tableau 6](#), permettent de mettre en évidence que l'incorporation percutanée de l'uranium dépend très largement de l'intégrité de la barrière cutanée qu'est la couche cornée. Dans tous les cas de figure, que le passage soit accru par des lésions de la barrière cutanée ou que celle-ci fasse agisse comme réservoir d'uranium et le rende ainsi biodisponible, il apparaît nécessaire de prendre en charge très rapidement de telles contaminations. L'absence de modèles reproductibles et réalistes des blessures induites par coupures et piqûres superficielles est constaté, ce type de lésions n'ayant été pris en compte que lors de blessures profondes comme nous le verrons par la suite. C'est pourquoi l'un des objectifs des travaux expérimentaux présentés à la fin de ce manuscrit a été de développer de tels modèles de lésions.

Tableau 6 : Diffusion de l'uranium après contamination sur d'une peau blessée superficiellement

Objectif de l'étude	Modèle de l'étude	Contamination cutanée par l'uranium						Résultats	Référence bibliographique
		Composé de U	Quantité de U	Volume déposé	Aire cutanée contaminée	Epaisseur de la peau	Durée		
Cinétique de diffusion percutanée de U sur peau excoriée (<i>tape stripping</i>)	<i>Ex vivo</i> : Peau dorsale de rat <i>hairless</i>	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 1	1,4 µg (500 Bq en ^{233}U)	100 µL	1,77 cm ²	Peaux entières : 1,50 mm	24 h	- U traverse en 30 min (forte augmentation en comparaison à la peau intacte) - Couche cornée = barrière protectrice de la peau	Petitot <i>et al.</i> 2004
	Peau d'oreille de porc					1,34 mm			
Cinétique de diffusion percutanée de U sur peau excoriée (<i>tape stripping</i>)	<i>Ex vivo</i> : Peau d'oreille de porc	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 5	6 µg	600 µL	1,76 cm ²	Intacte : 1,07 mm Excoriée : 0,92 mm	24 h	- Passage de U au travers d'une peau excoriée >> peau intacte - Accumulation de U sur la strate la plus externe de la couche cornée, pas d'accumulation significative sur peau excoriée : effet barrière confirmé	Spagnul <i>et al.</i> 2010b, 2011
Cinétique de diffusion percutanée de U après brûlures chimiques ou excoriation	<i>In vivo</i> : Peau dorsale rasée de rat Wistar	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 1	474 µg	200 µL	1,77 cm ²	-	24 h	- U dans le derme en 30 min quelle que soit la blessure - Rétention U ↗ quand acidité de la solution de contamination ↗, soit quand la gravité de la brûlure ↗ : diffusion retardée - En cas de rétention de U au site de contamination : incorporation de U sous-estimée par les premiers dosages de U dans les urines - Passage de U au travers d'une peau excoriée plus important qu'au travers d'une peau brûlée	Petitot <i>et al.</i> 2007a,b
		Poudre de $UO_2(NO_3)_2$	2,844 mg	-					
Effets toxiques après contamination par U sur peau écorchée	<i>In vivo</i> : Peau dorsale de souris écorchée par une lame de rasoir	Solution de $UO_2(NO_3)_2$	150 mg	3 gouttes	1 cm ²	-	10 j	- Mort de plus de la moitié des souris contaminées à 10 j - Perte de masse corporelle significative des souris ayant survécu - U incorporé concentré dans les reins	Xu <i>et al.</i> 2008
Influence du pH et de la concentration en U de la solution de contamination	<i>In vivo</i> : Injection sous-cutanée, rat Wistar	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 1 et 7	0,72 et 2,88 mg	0,27 mL	-	-	1, 3, 6 et 24 h	- Rétention de U au niveau du site de dépôt en cas de contamination acide - Excrétion de U dépend de sa forme chimique, et excrétion fécale de U peut ↗ si concentration rénale en excès	Fukuda <i>et al.</i> 2009a

3.3.3. Peau présentant des blessures profondes

Afin d'évaluer le devenir de l'uranium suite à une contamination cutanée survenant lors de manipulations d'objets contondants ou coupants, des expérimentations mimant des blessures profondes chez l'animal ont été menées.

Dans ce cadre, la contamination par un dépôt intramusculaire d'uranium a été réalisée pour mimer l'action d'un objet coupant chez le rat, et un dépôt intermusculaire a modélisé la blessure contaminée contondante (Houpert *et al.* 2004). Pour cela, les incisions ont été effectuées sur une patte de chaque rat, puis la contamination a été réalisée par dépôt inter ou intramusculaire d'une solution de nitrate d'uranyle. 10 min après contamination, entre 70 et 75 % de l'uranium déposé ont été retenus dans les espaces inter et intramusculaire, la teneur dans le reste du corps étant d'environ 30 %. Après 15 min de contamination, le transfert de l'uranium à la circulation sanguine est significativement plus important en cas de contamination intramusculaires, avec environ 25 % au site de dépôt, contre environ 55 % lorsque le dépôt est intermusculaire. A l'inverse, la teneur en uranium dans le corps entier soustraite du contenu du site était plus importante après dépôt intramusculaire (environ 75 %) qu'après dépôt intermusculaire (environ 45 %). Une augmentation de la rétention dans le squelette a également été observée avec environ 0,8 % et 0,5 % à 15 min dans le fémur droit, respectivement après dépôt intra et intermusculaire. D'après ces études, l'incorporation d'uranium sous forme soluble est donc plus importante et plus rapide en cas de coupure profonde qu'en cas de contusion.

D'autres études ayant pour objectif de mimer une coupure profonde contaminée par du MOX (Mixed OXide : mélange d'oxyde d'uranium et d'oxyde de plutonium) ont utilisé ce modèle de lésion par incision intramusculaire (Griffiths *et al.* 2012). Une fois encore, la rétention de la contamination au niveau du site de dépôt a été importante (98 % de la dose déposée 7 jours après contamination), avec une rapide rétention dans les organes cibles observée dans les 24 h, et augmentant jusqu'à 3 mois après contamination.

L'ensemble des résultats de ces études vont donc dans le même sens que ceux obtenus auparavant par Hengé-Napoli *et al.* (Henge-Napoli *et al.* 1999). En effet, ces derniers ont constaté que, 24 h après injection intramusculaire de nitrate d'uranyle chez le rat, environ 1,5 % de l'uranium injecté était retenu au niveau du site de l'injection, 17 % dans les reins et 37 % dans le squelette. Environ 40 % de l'uranium a directement été éliminé par voie urinaire.

Les plaies profondes contaminées ont également été modélisées chez le rat par injection intramusculaire de nitrate d'uranyle à pH 1 et 3,2 et à des concentrations différentes (Fukuda *et al.* 2005, 2009b). Ces études ont permis de valider une nouvelle fois l'effet dose de la contamination sur la mortalité des animaux suite à des dommages rénaux, puisque elle était d'autant plus importante que la dose administrée était

élevée. De plus, une importante rétention de l'uranium a été observée au niveau du site de dépôt lors d'une contamination par la solution à pH 1, confirmant l'effet du pH sur la rétention précédemment décrite (§ 3.3.2) dans les travaux de Petitot *et al.* et Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.* 2009a, Petitot *et al.* 2007a,b). Rappelons que ces effets toxiques dépendent non seulement de la dose, mais également de la forme chimique de l'uranium ainsi que de la voie et de la durée de contamination.

Par ailleurs, l'étude de l'influence du type de composé d'uranium sur l'incorporation de ce dernier suite à une injection intramusculaire (Houpert *et al.* 2001) a permis de démontrer la rétention majoritaire des composés peu transférables (tétraoxyde d'uranium, UO_4) au niveau du site d'injection, comparé au nitrate d'uranyle, avec respectivement environ 2 et 32 % de rétention 1 jour après contamination. A ce même stade, l'excrétion urinaire et la rétention dans le squelette est plus importante après contamination par du nitrate d'uranyle (respectivement environ 53 et 33 %) que par du tétraoxyde d'uranium (respectivement environ 27 et 21 %). L'excrétion urinaire de l'uranium dans ce dernier cas se voit augmenter 3 jours après contamination (environ 41 %).

Enfin, un dernier modèle de blessure profonde consistant en l'implantation intramusculaire de fragments d'uranium appauvri chez le rat a permis l'étude de la diffusion de cet élément au cours des 18 mois suivant l'insertion du fragment (Pellmar *et al.* 1999). Ainsi dès le premier jour de l'étude, des quantités significatives d'uranium ont été retrouvées dans les organes cibles que sont les reins et les os des animaux ayant reçu les plus fortes doses d'uranium, ces quantités augmentant avec le temps d'exposition. Cette rétention s'est également retrouvée chez les rats ayant reçu la plus faible dose 12 à 18 mois après l'implantation. 1 à 6 mois après contamination selon l'exposition des animaux, des quantités significatives d'uranium ont également été retrouvées dans le foie et la rate. Durant ces 6 premiers mois, l'excrétion urinaire du radioélément a crû et s'est stabilisée passé ce délai. Le taux d'uranium dans la circulation sanguine est devenu quant à lui significatif 6 à 18 mois après contamination, et de l'uranium a également été retrouvé dans le cerveau et les testicules des animaux respectivement 1 et 18 mois après l'implantation des fragments. Ces quantités sont directement corrélées à la teneur en uranium de ces fragments.

L'ensemble de ces études, résumées dans le [tableau 7](#), confirment donc qu'après contamination au sein de lésions profondes, la rétention de l'uranium au niveau de ces plaies est d'autant plus importante que la solution ayant servi à la contamination est acide, et dépend également du type de composé d'uranium constituant la contamination. En effet, la rétention de l'uranium au niveau de la blessure sera d'autant plus importante que le composé sera moins soluble. Tout comme dans le cas des peaux intactes ou présentant des lésions superficielles contaminées (§ 3.3.1 et 3.3.2), un phénomène de retardement de la distribution de l'uranium dans l'organisme se produit, entraînant une sous-estimation de la dose incorporée lors de l'analyse radiotoxicologique des premières urines. De plus, la contamination par

l'insertion de fragments contaminés est d'autant plus préoccupante qu'elle constitue également un réservoir à partir duquel l'uranium pourra librement diffuser dans le temps.

Il apparait donc que le devenir de l'uranium après une contamination cutanée est complexe puisqu'il dépend de nombreux facteurs, à commencer par l'état de la peau contaminée, pouvant présenter des lésions superficielles ou profondes, et de la forme physico-chimique du contaminant. D'une façon générale, une contamination cutanée constitue une voie d'entrée préoccupante de l'uranium dans l'organisme pouvant conduire à des effets toxiques non désirables. C'est pourquoi il est nécessaire que soit mis en place des traitements d'urgence permettant une décontamination rapide et efficace des zones cutanées contaminées.

Tableau 7 : Diffusion de l'uranium après contamination sur blessure profonde

Objectif de l'étude	Modèle de l'étude <i>in vivo</i>	Contamination cutanée par l'uranium				Résultats	Référence biblio- graphique
		Composé de U	Quantité de U	Volume déposé	Durée		
Distribution de U	Injection intramusculaire Rat Sprague Dawley	Solution de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ pH 4,2	0,93 µg	≈ 108 µL	1 à 4 j	- Faible rétention de U au niveau du site d'injection - Rétention rénale et osseuse ≈ 50 % - Excrétion urinaire à 24 h ≈ 40 %	Henge-Napoli <i>et al.</i> 1999
Influence de la forme physico-chimique de U sur sa diffusion	Injection intramusculaire Rat Sprague Dawley	Solution de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ et de UO_4 pH 5	0,66 µg et 63 µg	-	1 à 3 j	- Le composé le moins transférable (UO_4) est plus retenu au niveau du site d'injection que le composé soluble ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$) - Rétention rénale et osseuse ≈ 1/3 de la quantité injectée - Excrétion urinaire ≈ 1/2 à 1/3 de la quantité injectée	Houpert <i>et al.</i> 2001
Comparaison de la cinétique de diffusion de U après contamination sur 2 types de lésions profondes	Dépôt intra et intermusculaire après incision Rat Sprague Dawley	Solution de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ pH 5	0,7 µg (248 Bq)	50 µL	5, 10, 15, 30 et 60 min, 24 h	- Transfert de U à la circulation sanguine + important et + rapide en cas de coupure profonde (intramusculaire) qu'en cas de contusion (intermusculaire)	Houpert <i>et al.</i> 2004
Effets toxiques après contamination par U sur blessures profondes	Injection intramusculaire Rat Wistar	Solution de $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ pH 3,2	1,5 à 23, 94 mg	-	7 j	- Rétention de U au niveau du site d'injection dans le cas de la contamination la plus acide - Apparition de dommages rénaux - Mortalité ↗ quand quantité injectée ↗	Fukuda <i>et al.</i> 2005, 2009a
		pH 1	1,5 mg	3,7 µL	6 j		
Diffusion et effets toxiques après insertion sous-cutanée de fragments contaminés par U	Implantation intramusculaire de fragments contaminés par U Rat Sprague Dawley	Fragments de U appauvri (métal)	4, 10 et 20 fragments	-	1 j à 18 mois	- Fragments contaminés = réservoir de U diffusant au cours du temps - Détection de U dès le 1 ^{er} jour dans les reins et os des rats les plus fortement contaminés. Quantité ↗ dans ces organes cibles avec la dose - Détection dans le sang, le cerveau et les testicules	Pellmar <i>et al.</i> 1999
Diffusion après contamination à court et long terme par du MOX	Incision intramusculaire Rat Sprague Dawley	MOX (81 % de U)	20 et 30 kBq	50 µL	2 h à 3 mois	- Rétention importante au niveau du site de dépôt - Rapide rétention dans les organes cibles à 24 h, accumulation ↗ pendant 3 mois	Griffiths <i>et al.</i> 2012

3.4. Traitements d'urgence spécifique de la contamination cutanée par l'uranium

3.4.1. Traitements actuels

Lors d'une contamination cutanée par l'uranium, la méthode de décontamination la plus couramment utilisée consiste en un simple rinçage de la zone contaminée par de l'eau tiède et du savon. Cependant, ces recommandations peuvent différer selon les organisations de références, comme l'illustre le [tableau 8](#).

En effet, les procédures de l'AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique) ([IAEA 1996, 2005](#)) recommandent dans un premier temps un lavage de la peau à l'eau à l'aide d'une solution contenant un savon courant ou un détergent ayant si possible un pH légèrement acide (environ 5). Puis il convient de poursuivre cette décontamination par un lavage à l'aide d'une solution d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à 10 % ou d'une solution aqueuse légèrement acide (pH d'environ 4) d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) à 1 % ([Figure 13](#)). Si ces procédures de lavages ne sont pas suffisamment efficaces, un lavage par une solution aqueuse de permanganate de potassium à 5 % peut alors être envisagé. Celui-ci ne peut cependant pas être appliqué sur le visage ni au niveau des orifices naturels et des régions génitales de par son pouvoir abrasif sur la peau.

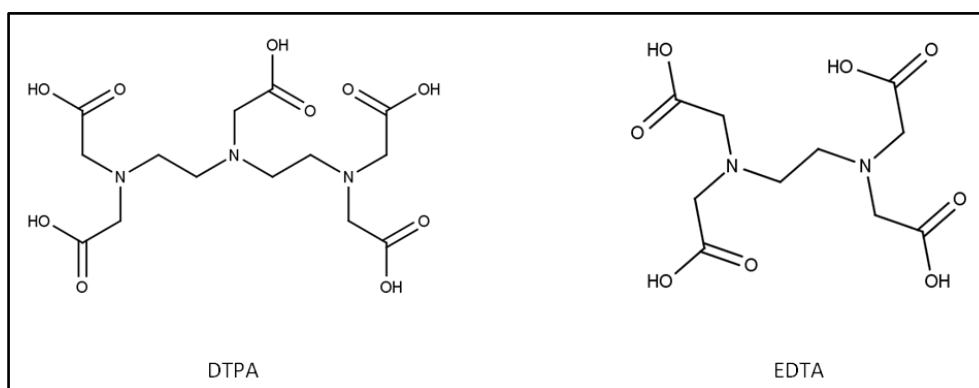


Figure 13 : Molécules d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) et d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)

Le guide nationale de l'ASN (Autorité de Sureté Nucléaire) concernant « l'intervention médicale en cas d'évènement nucléaire » préconise en tant que traitement d'urgence de disperser localement une solution de sel calcique trisodique du DTPA (CaNa_3DTPA) à 25 % sur toute plaie ou brûlure afin de minimiser la fixation des radionucléides ([ASN 2008](#)). En l'absence de plaie, une contamination externe de faible importance peut être traitée en urgence par l'application de compresses imbibées de savon liquide ou d'une solution de CaNa_3DTPA à 25 %. En cas de contamination plus importante, une douche non agressive avec de l'eau additionnée de savon après protection des plaies par pansement étanche peut être réalisée.

Ainsi les procédures de décontamination proposées par l'AIEA et l'ASN restent très générales, et ne prennent pas en compte de façon spécifique le type de radionucléide à l'origine de la contamination. En effet, comme il a déjà été mentionné dans le [chapitre 2.4](#) portant sur les traitements actuels des

contaminations, le DTPA ne constitue pas un bon chélateur de l'uranium, et pourrait même potentialiser ses effets néphrotoxiques une fois dans l'organisme. De plus, le lavage de la peau à l'eau savonneuse peut parfois conduire à une augmentation de l'absorption cutanée du toxique par le phénomène de "wash-in effect" (Moody & Maibach 2006), provoqué notamment par l'élévation du taux d'hydratation cutanée et la détérioration de la couche cornée par les tensioactifs constitutifs des savons. Il apparaît donc impératif que la solution de décontamination employée ne soit pas irritante pour la peau, et prenne également en compte l'état de la zone cutanée contaminée, la spéciation chimique et biologique de l'uranium, et le temps d'intervention après l'accident (Ansoborlo *et al.* 2007, Sharma *et al.* 2010).

Dans ce contexte, aucun traitement d'urgence spécifique à l'uranium et efficace en cas de contamination cutanée n'est disponible. C'est pourquoi le développement et la mise en place de dispositifs adaptés sont essentiels.

L'imprégnation de l'uranium dans la peau est gouvernée par trois mécanismes que sont la diffusion, l'attraction cellulaire et le flux osmotique. Aussi, outre l'action mécanique d'entraînement propre à toute solution qui permet d'éliminer une partie de l'uranium à la surface de la peau, les traitements de décontamination développés devront s'opposer aux différents mécanismes de diffusion pour être efficaces. Afin de permettre le déplacement de la substance à l'origine de la contamination de l'intérieur vers l'extérieur du tissu cutané, ils devront donc inverser la diffusion de l'uranium, et/ou avoir une affinité plus grande pour cet élément que n'en ont les constituants biologiques sur lesquels il est fixé. Une autre méthode serait de créer un flux osmotique inverse allant de l'intérieur vers l'extérieur, sans pour autant altérer les propriétés de barrières de la peau sous peine d'augmenter l'absorption percutanée de l'uranium.

Le chapitre suivant s'attachera donc à présenter les différents traitements spécifiques de décontamination des zones cutanées contaminées actuellement à l'étude, visant à limiter l'incorporation de l'uranium.

Tableau 8 : Recommandations des agences internationales et des autorités nucléaires, pour la décontamination radiologique de la peau
(Tazart *et al.* 2013)

Recommandations	Peau intacte	Peau lésée
NCRP (1980)	Eau savonneuse ou détergent + agent chélatant (EDTA/DTPA) Eau de javel Permanganate de potassium + bisulfite de sodium Dioxyde de titane (corps seulement)	Abrasion : détergent + anesthésique local (lidocaine 4 %) Blessure : eau stérile saline
IAEA (1998)	Eau tiède savonneuse	Solution saline
WHO/IAEA (2002)	Eau chaude savonneuse ou détergent légèrement acide	Pas de recommandations spécifiques
DHS (2003)	Eau savonneuse Eau + hexachlorophène + povidone iodée 3 %	Eau savonneuse Eau + hexachlorophène + povidone iodée 3 %
CDC (2007)	Eau chaude savonneuse	Pas de recommandations spécifiques
HPA (2008)	Eau savonneuse	Solution saline isotonique
ASN (2008)	Eau savonneuse, DTPA pour une contamination résiduelle	DTPA
ETHREAT (2008)	Eau savonneuse ou eau de javel à 0,1 %	Pas de recommandations spécifiques
SCK-CEN, NRPA, HPA, WHO, STUCK, Enviro and CLOR (2009)	Eau savonneuse tiède ou détergent Permanganate de potassium + réducteur Eau de javel à 1 % Mélange abrasif Pommade anti-inflammatoire pour fixer la contamination	Solution saline isotonique
AFFRI (2010)	Eau savonneuse, eau de javel à 0,5 %	Pas de recommandations spécifiques

3.4.2. Traitements à l'étude

Une contamination par du nitrate d'uranyle sur une peau superficiellement lésée doit être traitée durant les 30 premières minutes suivant la contamination pour éviter la fixation de l'uranium dans l'épiderme viable, autrement les composés seront difficilement retirés et deviendront biodisponibles. Une stratégie de traitement local appliqué directement au niveau de la lésion contaminée semble la voie la plus efficace pour diminuer l'absorption des radionucléides après une contamination cutanée. Ce type de traitement local doit être facile à utiliser et s'appliquer localement au niveau de la lésion afin de pouvoir être employé directement par le travailleur avant son transfert au service médical, où un traitement plus complet pourra être entrepris (Houpert *et al.* 2001).

Les trois principales stratégies adoptées dans le but de pallier l'absence de traitement d'urgence lors de contamination cutanée par l'uranium vont être présentées dans les chapitres suivants. Un accent particulier sera mis sur les études portant sur l'utilisation de chélatants ayant une affinité spécifique pour l'uranium, puisque celles-ci sont majoritaires.

3.4.2.1. Par inversion de diffusion de l'uranium

La première stratégie en vue de diminuer le passage de l'uranium au travers de la peau consiste en l'inversion de sa diffusion. Pour cela, un simple lavage à l'eau pure devrait pouvoir suffire, puisqu'il va permettre aux radioéléments de diffuser du milieu le plus concentré vers celui qui le sera moins, en l'occurrence l'eau de lavage dont la concentration est initialement nulle, selon la loi de diffusion de Fick vue précédemment (§ 3.1.2). Cependant, l'eau pure présente un faible pouvoir mouillant, c'est-à-dire une faible capacité à s'étaler sur une surface. Afin d'augmenter ce dernier, des agents détergents sont alors additionnés à l'eau, dont notamment des tensio-actifs, et vont permettre de diminuer sa tension superficielle.

L'utilisation de détergents permet non seulement d'augmenter la surface de contact entre le liquide de lavage et la peau, mais le pouvoir décontaminant de ce dernier s'en verra également renforcé. En effet, les tensioactifs étant des molécules dites « bipolaires », c'est-à-dire présentant une extrémité hydrophile chargée, polaire, et une partie hydrophobe, apolaire, ils vont avoir la particularité de s'organiser en solutions aqueuses selon deux configurations distinctes (Figure 14). Les tensioactifs peuvent donc former une micelle, monocouche présentant leurs extrémités hydrophiles vers l'extérieur, créant ainsi une cavité hydrophobe à l'intérieur. Cela permet d'y englober des particules organiques hydrophobes, telles que par exemple des salissures grasses sur lesquelles de l'uranium aura pu s'adsorber (Petitot 2010). Celles-ci pourront ensuite être éliminées facilement par rinçage. La plupart du temps, l'uranium se trouve sous forme de sels d'hydroxydes, de nature ionique. Dans ce cas, les tensioactifs forment une bicouche de

molécules appelée liposome, pour former une cavité présentant les groupements hydrophiles pouvant englober les particules électriquement chargées, tels que les radionucléides.

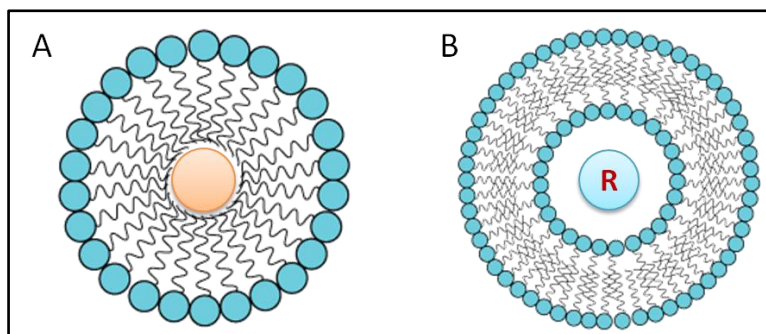


Figure 14 : Représentation schématique d'une micelle et d'un liposome

(A) Monocouche de tensioactifs formant une micelle, englobant une particule organique hydrophobe (disque orange) ;

(B) Bicouche de molécules tensioactives formant un liposome, englobant une particule hydrophile chargée (disque bleu central) comme cela est souvent le cas pour les radionucléides (R). (Petitot 2010)

Cependant, l'emploi d'agents tensioactifs dans le cadre de la décontamination cutanée ne constitue en aucun cas un traitement qui soit spécifique aux radiocontaminants. De plus, il présente également un risque de détérioration de la couche cornée, potentialisant alors le passage des actinides tel que l'uranium au travers de la peau par le phénomène de « wash-in effect » (§ 3.4.1), le rendant ainsi biodisponible.

3.4.2.2. Par inversion du flux osmotique de l'uranium

La deuxième stratégie de décontamination consiste à jouer sur le flux osmotique, qui tend à faire migrer l'eau de l'extérieur de l'organisme vers l'intérieur, et favoriser ainsi la pénétration de l'uranium au travers des différentes strates de la peau. En inversant ce mécanisme par dépôt d'un soluté hypertonique ou d'une substance très hydrophile hautement absorbante au niveau de la zone cutanée contaminée, la décontamination est facilitée. L'efficacité de décontamination par inversion du flux osmotique a en effet été démontrée expérimentalement au cours de nombreuses études (Tymen *et al.* 2000b). D'après les auteurs, la faible osmolarité de la solution d'EHBP employée au cours de leurs études *ex vivo* expliquerait sa moindre efficacité par rapport à une solution de DTPA.

Outre l'utilisation de solutions hypertoniques, l'inversion du flux osmotique au niveau de la zone cutanée contaminée par de l'uranium a également été obtenue par l'utilisation de pansements composés de polymères, ayant ainsi un haut pouvoir absorbant de par leur grande affinité pour l'eau.

Ainsi, 5 min après contamination intermusculaire par du tétraoxyde d'uranium (UO_4) chez le rat, l'application au niveau de l'incision durant 1 h d'un pansement de type hydrocolloïde composé d'une pâte de carboxyméthylcellulose sodique, connu pour être fortement absorbant, permet de retenir 40 % de l'uranium initialement déposé au niveau de la plaie (Houpert *et al.* 2004). Dans le cas d'une contamination intramusculaire, l'efficacité du pansement diminue puisqu'il ne retient cette fois que 30 % de la quantité

initiale d'uranium injectée. Il est également apparu que le temps de contact du pansement avec la plaie n'a pas d'influence significative sur son efficacité de décontamination.

L'utilisation de forme gélifiée a permis d'obtenir une diminution significative de la concentration en uranium au niveau des reins de rats contaminés *in vivo* par rapport aux animaux non traités (Xu *et al.* 2008, Yang *et al.* 2005). Cette efficacité a encore une fois été essentiellement due à la capacité absorbante de ces pansements hydrogels, comme l'avaient d'ailleurs démontré Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2004). Le pouvoir décontaminant des formes gels apparaît toutefois moins important que celui des pansements, notamment lors de temps de pause relativement court, avec respectivement environ 9 % de rétention de l'uranium déposé pour le gel contre 48 % pour le pansement, après un contact de 15 min (Houpert *et al.* 2004).

Cependant, l'amélioration de l'efficacité des gels et pansements développés par l'ajout de chélateurs au sein des formules n'a pas été prouvée (Xu *et al.* 2008, Yang *et al.* 2005), allant même jusqu'à diminuer leur pouvoir décontaminant (Houpert *et al.* 2004).

Les différents travaux menés chez le rat sur des modèles de plaies profondes contaminées par de l'uranium ont ainsi permis de démontrer une certaine efficacité des formules de types pansement et gel. En effet, ces derniers ont permis la rétention de l'uranium au niveau du site de dépôt, permettant une diminution de sa rétention rénale. L'uranium ainsi retenu pourrait ensuite être retiré par excision chirurgicale de la zone contaminée, réduisant alors fortement sa biodisponibilité. Néanmoins, un tel traitement ne peut être réalisé en urgence immédiatement après la contamination, puisque seul un personnel du corps médical est habilité à réaliser des injections ainsi que tout acte chirurgical. Des études complémentaires évaluant le bénéfice de ces traitements sur des temps de traitement différés prenant en compte le temps de transport de la victime du lieu de contamination jusqu'au service médical serait intéressant. Cependant, le pouvoir décontaminant de ces formules ne réside que par le phénomène d'absorption physique de la solution contaminée au sein des dispositifs, l'uranium n'étant alors en aucun cas retenu de façon spécifique à l'intérieur de ces pansements ou gels. Cela peut ainsi présenter un risque de relargage de l'uranium vers l'extérieur du système à tout moment. Aussi il paraît nécessaire que de premiers traitements d'urgence, spécifiques à la chélation de l'uranium et applicables immédiatement après la contamination, soient disponibles et utilisables sur le lieu de l'incident.

3.4.2.3. Par chélation de l'uranium

La troisième et dernière stratégie de décontamination cutanée consiste en l'utilisation de chélatants spécifiques de l'uranium. Il s'agit de molécules pouvant enserrer dans son réseau tridimensionnel l'élément radioactif sous forme ionique ou complexé, la fixation étant stabilisée à la manière d'une pince par au

moins deux liaisons de coordination. L'objectif est alors de masquer l'uranium vis-à-vis de ces ligands biologiques potentiels. De plus, un chélatant doit posséder une faible constante de dissociation avec le radionucléide dans une vaste gamme de pH pour éviter que ce dernier ne puisse se libérer et se déposer au niveau des ligands biologiques rencontrés (Petitot 2010).

Les chélateurs préconisés pour le traitement des contaminations cutanées par des radionucléides font partie de la famille des **acides polyaminopolycarboxyliques**, avec l'acide éthylène diamine tétraacétique (**EDTA**) et l'acide diéthylène triamine pentaacétique (**DTPA**) (ASN 2008, IAEA 1996, 2005; Rojas-Palma *et al.* 2009) (§ 2.4 et § 3.4.1 Figure 13), l'EDTA ayant été délaissé au profit du DTPA présentant une efficacité sur un spectre plus large de radionucléides. D'après des études menées *in vitro* (Tymen *et al.* 2000a), trois applications successives durant 5 min d'une solution à 25 % de CaNa_3DTPA permettrait de retirer environ 83 % du nitrate d'uranyle déposé sur une peau humaine intacte. Cependant, les complexes formés entre l'uranium et le DTPA seraient peu stables et leur efficacité discutée (Durbin 2008, Kullgren *et al.* 2013, Paquet & Ramounet 1998).

C'est pourquoi l'utilisation d'autres chélateurs est actuellement à l'étude, et ce chapitre en présente les plus prometteurs.

Parmi ceux-ci peuvent être cités les **analogues synthétiques des sidérophores** (molécules sécrétées notamment par les micro-organismes permettant la chélation du fer essentiel à leur développement), dérivés d'hydroxypyridone tel que le **LIHOPO** (3,4,3-LI(1,2-HOPO)) (Figure 15). L'avantage de ce dernier réside dans le fait qu'il présente une affinité pour d'autres actinides que l'uranium, tels que le plutonium et l'américium.

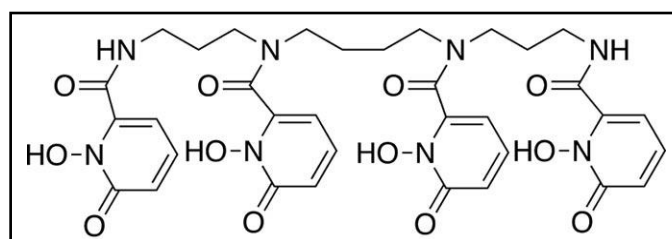


Figure 15 : Molécule de 3,4,3-LI(1,2-HOPO)
(Abergel *et al.* 2010)

L'efficacité de chélation de l'uranium, par injection de cette catégorie de molécule, a été démontrée *in vivo* après contamination interne de rongeurs (Durbin 2008, Hengé-Napoli *et al.* 1998). En effet, l'injection intramusculaire chez le rat de 3,4,3-LI(1,2-HOPO) immédiatement après contamination par du nitrate d'uranyle (Henge-Napoli *et al.* 1995) permet de réduire la rétention d'uranium dans les reins et le fémur. L'excrétion urinaire de l'uranium est également augmentée. Une injection différée de 30 min de 3,4,3-LI(1,2-HOPO) paraît moins efficace contre le dépôt de l'uranium dans les os, et un traitement par voie

intrapéritonéale s'est également avéré moins efficace. De plus, lorsque la concentration en chélatant du traitement est diminuée, le ratio ligand/uranium devient trop faible pour obtenir une efficacité de décontamination. Cette efficacité se voit également diminuée si l'injection n'est pas réalisée immédiatement après contamination, et ce même après des administrations répétées (Hengé-Napoli *et al.* 1998). Cela indique donc que les molécules de LIHOPO étudiées sont en concurrence directe avec des ligands biologiques de l'uranium dans le sang, et qu'elles ne peuvent chélater l'uranium une fois celui-ci lié aux cellules. De plus, ce traitement ne peut être envisagé comme traitement d'urgence sur le lieu de contamination car tout comme les gels et pansements présentés précédemment (§ 3.4.2.2), seul le corps médical est habilité à effectuer des injections. Néanmoins, une étude d'efficacité de ces chélatants dans le cadre de traitement local d'une peau intacte ou lésée pourrait être envisagée.

Des **composés organiques du phosphore**, connus pour leur affinité de chélation avec l'uranium (Hengé-Napoli *et al.* 1998), ont également été étudiés pour le traitement de contaminations par ce radionucléide. Parmi eux se trouvent l'acide aminométhane biphosphonique ou AMBP, connu pour ses propriétés chélatrices de l'uranium et utilisé en chimie d'extraction sélective des minerais, ainsi que l'un de ses homologues, l'**acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate** ou **EHBP** (également désigné sous le nom d'acide éthane hydroxydiphosphonique ou EHDP) (Figure 16). Ce dernier présente l'avantage d'avoir d'ores et déjà une application en clinique et bénéficie d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en tant qu'agent thérapeutique depuis 1990 dans un médicament commercialisé sous le nom de Didronel®, indiqué dans le traitement de l'ostéopénie (baisse de la densité osseuse qui précède l'ostéoporose) et de l'hypercalcémie, sans effets secondaires majeurs (Tyment *et al.* 2000b).

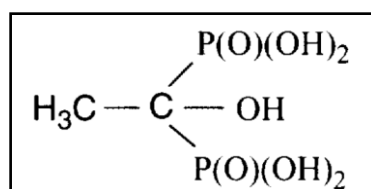


Figure 16 : Molécule d'acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP)
(Houpert *et al.* 2001)

Ainsi il a été démontré par des études *ex vivo* et *in vivo* que l'EHBP présentait une efficacité de décontamination plus importante que le DTPA après traitement local suite à une contamination par du nitrate d'uranyle (Tyment *et al.* 2000b, Ubios *et al.* 1994, 1998). Il a notamment été noté qu'à la suite d'une injection intramusculaire d'EHBP 5 min après contamination intramusculaire par du nitrate d'uranyle chez le rat (Henge-Napoli *et al.* 1999), la rétention rénale du radioélément est passé d'environ 70 % pour le groupe d'animaux contrôle à 24 %. Lorsque le traitement est différé de 30 min, la diminution de la quantité d'uranium retenue au niveau du rein est moins importante, passant d'environ 89 à 55 %. Dans le cas d'un traitement immédiat par voie intrapéritonéale d'EHBP, suivi d'une injection quotidienne pendant 3 j après

la contamination, 28 % de l'uranium initialement déposé sont retrouvés au niveau rénal. Aussi quelle que soit la voie d'injection, l'EHP favorise l'excrétion de l'uranium et réduit sa rétention dans les reins après contamination intramusculaire de rats par du nitrate d'uranyle. Les effets sur le squelette sont nettement plus faibles, et il a été constaté que l'EHP améliore les effets néfastes d'une dose létale orale de nitrate d'uranyle sur l'ossification primaire (Bozal *et al.* 2005). De plus, la réduction de la teneur en uranium dans les tissus dépend essentiellement du délai entre la contamination et le traitement.

Toutefois, d'après l'ensemble de ces études, si la peau n'est pas rincée après application locale de l'agent chélatant, il est apparu que les complexes radionucléide-EHP semblent diffuser davantage vers les couches inférieures de la peau que les complexes radionucléide-DTPA, pouvant alors potentiellement être distribués dans la circulation sanguine (Tyman *et al.* 2000a). Encore une fois, le traitement par injection ne constitue pas un traitement d'urgence. De plus, même si l'efficacité de l'EHP semble être prouvée, seules des études toxicologiques pourront confirmer la possibilité de l'utiliser en tant que décontaminant pour le tissu cutané (Tyman *et al.* 2000b). D'autres études complémentaires ont également permis de mettre en évidence l'efficacité accrue de décontamination par association de deux traitements : l'EHP et l'acide carballyl amido bisphosphonique (ou CAPBP), permettant, 3 jours après contamination par du nitrate d'uranyle, de diminuer significativement (d'un facteur 2) la quantité d'uranium dans les reins (Houpert *et al.* 2001).

D'autres études visant à incorporer des molécules de **bisphosphonate** comme ligands des ions uranyle, notamment du **pamidronate** (Figure 17), dans des formules de type hydrogels ont été menées (Xu *et al.* 2008). Les formulations étudiées semblent présenter une efficacité de décontamination. Cependant l'intérêt de l'apport du chélatant n'a pas été clairement démontré puisqu'aucun animal n'a été traité par des hydrogels non chargés. Cette efficacité pourrait donc être associée à la capacité absorbante de ces derniers (§ 3.4.2.2).

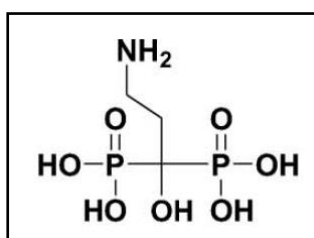


Figure 17 : Molécule de pamidronate (Xu *et al.* 2008)

L'effet d'un nouvel agent chélatant a également été étudié en tant que traitement local de contamination sur blessures, il s'agit de l'**acide catechol-3,6-bis-methyliminodiacétique** ou **CBMIDA** (Figure 18) (Fukuda *et al.* 2005, 2006, 2009a,b). D'après ces études *in vivo* (Fukuda *et al.* 2005), l'administration de CBMIDA permet de prévenir les effets toxicologiques de l'uranium, puisqu'après injection intramusculaire d'une

dose de 2 mg.kg^{-1} d'uranium, le taux de survie des rats ayant reçu 240 mg.kg^{-1} et 480 mg.kg^{-1} de CBMIDA est respectivement de 50 et 80 %, contre 20 % pour les rats non traités. De plus, après contamination par du nitrate d'uranyle, une meilleure efficacité de décontamination est obtenue après traitement par le CBMIDA que par l'EHBP. En effet, l'utilisation de CBMIDA permet, dans le cadre de ces expérimentations, une réduction significative de la quantité d'uranium au site d'injection, ainsi qu'une accélération de son excrétion urinaire et fécale. Une diminution de la rétention dans les reins et les os est également observée si l'administration est réalisée dans un délai de 2 h après contamination par du nitrate d'uranyle à 4 mg.kg^{-1} à pH 1. Il a cependant été observé que l'efficacité de chélation varie en fonction du pH (Fukuda *et al.* 2006). En effet, lorsque la contamination est réalisée à pH 7, l'uranium forme des complexes par hydroxylation, et l'efficacité de chélation de l'uranium par le CBMIDA diminue. Aucune modification significative de l'efficacité n'a été notée quant à la voie d'administration de l'agent chélatant, puisqu'une augmentation de l'excrétion urinaire et une diminution de la rétention rénale ont été observées aussi bien par administration orale de CBMIDA que par voie parentérale (Fukuda *et al.* 2009b).

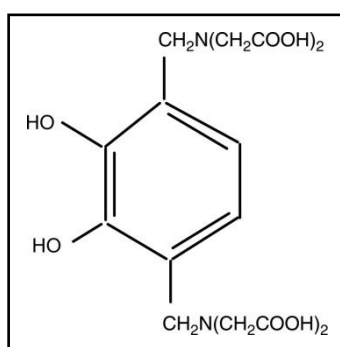


Figure 18 : Molécule d'acide catéchol-3,6-bis-méthyliminodiacétique (CBMIDA) (Fukuda *et al.* 2009b)

Une dernière famille d'agents chélatants, les **calixarènes**, a également été étudiée dans le cadre de la décontamination cutanée. Parmi eux, le *p-tert*butylcalix[4]arène a été incorporé dans une nanoémulsion de type huile dans eau (H/E) par une équipe de chercheurs en Inde (Rana *et al.* 2014). Bien que leurs études ne portent pas sur le traitement de contamination cutanée par l'uranium, leurs expérimentations démontrent une efficacité de décontamination de leur formule suite à des contaminations au technetium-99m, à l'iode-131 et au thallium-201. Cette étude est basée en partie sur celles menées depuis 2006 au sein de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire qu'est l'IRSN, en collaboration avec l'UMR CNRS 8612, qui ont permis le développement d'une nanoémulsion H/E incorporant des molécules de *p-tert*butylcalix[6]arène (Spagnul *et al.* 2010c), et dont l'efficacité *ex vivo* a été démontrée sur des peaux intactes ou lésées superficiellement par excoiriation, et contaminées par du nitrate d'uranyle (Spagnul *et al.* 2011).

L'utilisation de pansements permettant de créer un gradient osmotique de la peau vers la périphérie semble prometteuse dans le cadre du traitement de plaies contaminées par l'uranium. D'ailleurs, il est intéressant de noter que certains services de médecine du travail utilisent déjà ce type de stratégie de

décontamination en appliquant sur la plaie contaminée un gel antiphlogistique (Osmogel®). Cependant, ce traitement n'étant pas spécifique à l'uranium, le risque de relargage du radioélément et donc de sa biodistribution sont à prendre en considération. De plus, l'augmentation de l'efficacité de décontamination de ce type de formulation par adjonction d'un agent chélatant reste encore à être démontrée.

En ce qui concerne les plaies contaminées par l'uranium, l'utilisation en tant que traitement d'urgence d'un ou plusieurs agent(s) chélatant(s) ayant une meilleure affinité pour l'ion uranyle tels que des analogues synthétiques des sidérophores comme le LIHOPO, des composés organiques du phosphore comme l'EHPBP ou encore le CBMIDA ou des calixarènes devrait être envisagée. Le [tableau 9](#) présente un résumé des différents agents chélatants à l'étude cités ci-avant.

Les objectifs des travaux de thèse qui seront présentés dans la seconde partie de ce manuscrit sont, d'une part, d'approfondir l'étude de l'efficacité de cette nanoémulsion de calix[6]arène pour le traitement de contamination cutanée par l'uranium, mais également d'en étudier l'éventuelle irritabilité cutanée. Aussi, afin d'introduire au mieux la partie expérimentale, les chapitres suivant s'attacheront à décrire plus particulièrement cette molécule d'intérêt et les résultats antérieurs obtenus par incorporation de celle-ci dans des formulations adaptées aux traitements cutanés.

Tableau 9 : Traitements étudiés pour la décontamination et/ou la décorporation de l'uranium par des agents chélatants

Mode de traitement	Famille	Molécule(s)	Modèle d'étude	Résultats principaux	Référence bibliographique
Décontamination cutanée	Acides polyamino-polycarboxyliques	EDTA et DTPA	<i>Ex vivo</i> : - Peau dorsale de rat <i>hairless</i> - Peau abdominale humaine	- DTPA : efficacité sur un spectre plus large de radionucléides - Retrait d'environ 83 % de nitrate d'uranyle - Chélate U-DTPA : peu stable - Efficacité discutée	Durbin 2008, Kullgren <i>et al.</i> 2003, Paquet <i>et al.</i> 1998, Tymen <i>et al.</i> 2000a
	Biphosphonates	EHBP (ou EHDP)	<i>Ex vivo</i> et <i>in vivo</i> : - Peau dorsale de rat <i>hairless</i> - Peau abdominale humaine - Rats <i>hairless</i>	- Efficacité EHBP > DTPA - En l'absence de rinçage après traitement : complexe U-EHBP semble diffuser vers les couches inférieures de la peau	Tymen <i>et al.</i> 2000a
	Biphosphonates	Pamidronate	<i>In vivo</i> , souris écorchées par une lame de rasoir	- Incorporation dans des hydrogels - Efficacité de décontamination : effet du chélatant ou de l'hydrogel ?	Xu <i>et al.</i> 2008
	Calixarènes	<i>p</i> -tertbutylcalix[6]arène	<i>Ex vivo</i> , oreille de porc intacte/excoriée	- Efficacité d'extraction de U sur peaux intactes ou lésées par excoriation	Spagnul <i>et al.</i> 2011
Décontamination locale et/ou décorporant	Biphosphonates	EHBP (ou EHDP)	<i>In vivo</i> , rat Sprague Dawley Contamination intramusculaire	- Bénéficie d'une AMM (Didronel®) - Efficacité EHBP > DTPA après traitement local quelle que soit la voie d'injection	Bozal <i>et al.</i> 2005, Henge-Napoli <i>et al.</i> 1999, Tymen <i>et al.</i> 2000a
	Dérivés du catéchol	CBMIDA	<i>In vivo</i> , rat Wistar Injection de U intramusculaire	- Efficacité CBMIDA > EHBP - Efficacité varie selon le pH de la solution de contamination - Pas de différence entre administration par voie orale et parentérale	Fukuda <i>et al.</i> 2005, 2006
	Analogues synthétiques des sidérophores	LIHOPO	<i>In vivo</i> , rat Sprague Dawley Injection de U intramusculaire ou intraveineuse	- Réduction de la rétention rénale et osseuse de U - Augmentation de l'excrétion urinaire de U - Ratio ligand/U à prendre en compte - Efficacité diminuée si injection différée	Durbin 2008, Hengé -Napoli <i>et al.</i> 1995, 1998
	Acides polyamino-polycarboxyliques	DTPA et/ou EDTA	<i>In vitro</i> : LLC-PK ₁ , cellules tubulaires proximales de rein <i>In vivo</i> : (Ortega <i>et al.</i>): souris Swiss, administration de U sous cutanée (Houpert <i>et al.</i>): rat Sprague Dawley, injection intra-péritonéale de U	- <i>In vitro</i> : DTPA ↗ le taux de mortalité cellulaire induit par l'uranium - <i>In vivo</i> (1) : DTPA et EDTA ↗ l'accumulation de U dans les os. Pas ↗ excréctions urinaire et fécale de U avec DTPA, et ↘ avec EDTA - <i>In vivo</i> (2) : DTPA n'augmente pas la néphrotoxicité induite par U	Houpert <i>et al.</i> 2003, Muller <i>et al.</i> 2006a, Ortega & Domingo 1989

4. Nanoémulsion de calix[6]arène : une nouvelle approche pour un traitement d'urgence

4.1. Les calixarènes : définition et structure

Découvert en 1872 par Adolphe Von Bayer, un calixarène est une molécule macrocyclique composée de n unités phénoliques, reliées entre elles par un pont méthylène situé en position ortho des groupes hydroxyles (Figure 19). Leur synthèse résulte de la condensation entre un phénol para-substitué et un formaldéhyde.

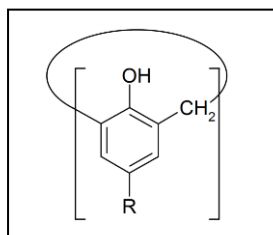


Figure 19 : Structure de base des calix[n]arènes

Cette configuration en forme de vase ou calice a valu à la molécule sa nomenclature en 1878 par David Gutsche (Gutsche 1989), "calix" signifiant vase en grec, et "arène" indiquant la présence de noyaux aromatiques formant un cycle. Le nombre (n) d'unités phénoliques constituant la molécule peut aller jusqu'à 20. Cependant, les calixarènes les plus fréquemment étudiés comportent 4, 6 ou 8 de ces unités phénoliques.

La maîtrise de la synthèse des calixarènes a permis la production de molécules fonctionnalisées très variées. En effet, ces molécules présentent deux bords au niveau desquels divers groupements fonctionnels vont pouvoir être ajoutés (Figure 20). Ainsi les groupements R_1 placés au niveau du bord supérieur de la molécule vont déterminer son comportement hydrophile ou lipophile, alors que les groupements R_2 présents en son bord inférieur seront choisis en fonction de leur propriété complexante dans le cadre de nos études. Les calixarènes offrent donc la possibilité de jouer sur plusieurs paramètres que sont la taille de la cavité, la fonctionnalisation de ses extrémités par des groupements d'intérêt et leurs propriétés de solubilité, afin de construire la molécule adéquate vis-à-vis de l'élément à extraire (Dinse *et al.* 1997).

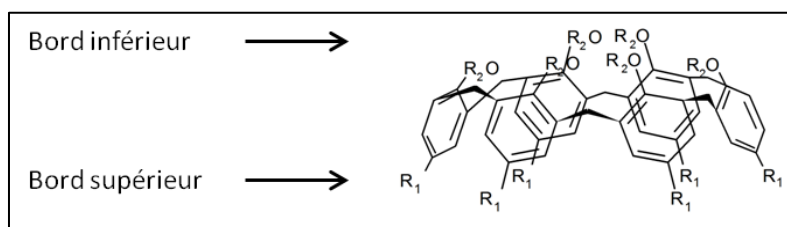


Figure 20 : Structure d'un calix[6]arène

4.2. Applications des calixarènes

Initialement employées dans la composition de plastiques synthétiques (Gutsche 1989), les molécules de calixarènes sont actuellement utilisées dans des domaines très variés. Elles sont notamment développées

dans le cadre d'applications biopharmaceutiques comme molécules bioactives présentant des propriétés antituberculinique, antivirale ou antibactérienne, ou encore comme inhibiteurs enzymatiques. Certains calixarènes modifiés par l'addition d'une chaîne hydrocarbonée peuvent également former des systèmes micellaires, des liposomes ou encore des nanoparticules permettant le transport et la libération contrôlée de principes actifs dans l'organisme (Da Silva *et al.* 2004a, Dibama *et al.* 2009, Rodik *et al.* 2009). D'autres peuvent être, quant à eux, employés pour la détection de molécules d'intérêt pharmaceutique telles que les stéroïdes (Da Silva *et al.* 2004a).

En dépit d'une toxicité hépatique de deux calixarènes, le sulfonate-calix[6]arène et le sulfonate-calix[8]arène, décrite dans une étude de 1994 (Archimbaud *et al.* 1994), des études *in vitro* plus récentes portant sur des calixarènes utilisés dans le domaine biopharmaceutique démontrent une faible toxicité au niveau cellulaire, permettant d'envisager son utilisation dans le domaine pharmaceutique, sous réserve d'études toxicologiques plus approfondies (Da Silva *et al.* 2004a,b). De plus, l'étude de la toxicité et de la biodistribution *in vivo* d'un calix[4]arène après injection intraveineuse chez la souris n'induit pas de toxicité pour une dose allant jusqu'à 100 mg.kg⁻¹. Une dose de 200 mg.kg⁻¹ n'est également pas létale, malgré la présence de calixarène dans le sang et les urines. Par extrapolation, une injection de ce calix[4]arène entre 2 et 5 g pourrait éventuellement être non toxique chez l'homme (60 - 100 kg). Ces données de toxicité n'ont bien évidemment pas été vérifiées chez l'homme (Coleman *et al.* 2008).

Les calixarènes ont également été envisagés en tant qu'agents complexants des actinides tels que l'uranium, le plutonium et l'américium pour des applications dans l'industrie du nucléaire, puisqu'ils permettent leur extraction sélective à l'état de traces dans des matrices biologiques telles que les urines, ou encore l'analyse d'éléments radioactifs dans les échantillons environnementaux (Baglan *et al.* 1999, Bouvier-Capely *et al.* 2009, Dinse *et al.* 1997).

Même si la complexation de calix[8]arènes avec les actinides a été étudiée, les études portant sur la complexation de l'uranium sous sa forme U(VI) ont essentiellement été menées avec les calix[4]arènes et les calix[6]arènes. Aussi le chapitre suivant s'intéressera plus particulièrement au 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène, molécule d'intérêt du présent sujet appartenant à la famille des calix[6]arènes.

4.3. Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène

La structure du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène (Figure 21) se présente sous la conformation conique, stabilisée en grande partie par la présence de six groupements encombrants *tert*butyle sur son bord supérieur, constituant une partie hydrophobe. Afin d'obtenir une extraction de l'uranium optimale, seuls trois groupements carboxyliques, connus pour leur forte affinité envers l'ion uranyle, ont été fonctionnalisés sur son bord inférieur, formant une partie hydrophile de la molécule, et lui

conférant une symétrie de type C_3 permettant d'obtenir la structure hexacoordonnée requise pour la chélation de cet ion. En effet, des travaux concernant le calix[6]arène ont montré que si les trois fonctions carboxyliques ainsi disposées étaient substituées par six fonctions acide carboxylique, la sélectivité d'extraction de l'ion uranyle s'en voyait diminuée (Araki *et al.* 1993, Dinse *et al.* 1997). Les liaisons hydrogène ainsi présentes entre les trois groupements carboxylique du bord inférieur de la molécule participent également à la stabilité de la molécule (Boulet *et al.* 2006a).

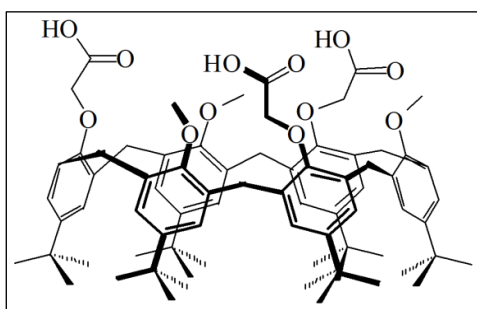


Figure 21 : Structure du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène

L'utilisation des calix[6]arènes pour l'extraction sélective de l'uranium a été introduite en 1987 par Shinkai *et al.* (Shinkai *et al.* 1986). Sur la base de ces études, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène a été développé pour l'extraction sélective des actinides dans les urines, en vue de son utilisation en routine pour l'analyse radiotoxicologique de celles-ci dans le cadre de la surveillance médicale des travailleurs de l'industrie nucléaire (Baglan *et al.* 1999, Bouvier-Capely *et al.* 2009, Dinse *et al.* 2000). En effet, des études en extraction liquide-liquide ont permis de démontrer son efficacité de chélation d'ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée (Baglan *et al.* 1997, Dinse *et al.* 1997). De plus, ces études ont permis de mettre en évidence que ce calixarène, de par son caractère amphiphile, permet d'extraire les ions uranyle (UO_2^{2+}) d'une phase aqueuse vers une phase organique. La chélation de ces ions est réalisée par échange protonique entre deux fonctions carboxyliques et une molécule de calixarène (LH_3) selon la réaction suivante :



Cette molécule présente donc de très bons résultats pour l'extraction sélective de l'uranium et un protocole permettant de séparer l'uranium, le plutonium et l'américium par ce calixarène a été proposé (Dinse *et al.* 2000). C'est ainsi que le Laboratoire de RadioChimie (LRC) de l'IRSN a mis au point des colonnes contenant ce *p*-tertbutylcalix[6]arène, permettant de séparer respectivement l'uranium, le plutonium et l'américium d'urines contaminées en vue de leur dosage respectif, de façon plus simple et plus rapide que les systèmes initialement employés (Boulet *et al.* 2006b, Bouvier-Capely *et al.* 2009, Poriel *et al.* 2007). Cette utilisation innovante des calixarènes a par ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet (Duval *et al.* 2006).

De plus, des études visant à utiliser le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène en tant qu'agent chélatant, pour la prise en charge du personnel de l'industrie nucléaire ayant fait l'objet d'une contamination cutanée par l'uranium, ont également été menées. Elles ont abouti au développement d'une nanoémulsion dont les principales caractéristiques vont maintenant être présentées.

4.4. Formulation intégrant le calix[6]arène

Les études menées par Spagnul *et al.* (Spagnul *et al.* 2010c) avaient pour objectif d'incorporer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène dans une formulation à usage cutané afin de le rendre disponible pour la chélation d'ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée. Ainsi, en cas de contamination cutanée, le transfert de cet élément au travers de la peau, et par conséquent son incorporation et sa toxicité, seraient limités. Afin de respecter les contraintes de formulation imposées par cette molécule de calixarène se trouvant sous forme de poudre hydrophobe, une nanoémulsion huile dans eau (H/E) a été réalisée afin que le calixarène se positionne à l'interface huile/eau de par son caractère amphiphile comme cela est schématisé sur la figure 22. Cette forme galénique a également été choisie par les auteurs afin d'être facilement applicable sur la peau et d'assurer une bonne action de surface. Le greffage ou la polymérisation de la molécule d'intérêt n'ont pas été envisagés en raison des contraintes et faibles rendements liés aux synthèses chimiques (Spagnul 2009).

La nanoémulsion, préparée par la méthode d'inversion de phase (Liu *et al.* 2006), a été réalisée avec 20 % d'huile de paraffine (huile minérale) dans laquelle le calixarène était préalablement incorporé ainsi que 5 % de tensio-actifs non ioniques (Twenn®80 et Span®80) (Spagnul *et al.* 2010c), choisis pour leur bonne tolérance cutanée et leur faible pouvoir pénétrant (Martini 2006). La phase aqueuse externe (75 %) favorise l'élimination de cette formulation par un simple rinçage à l'eau.

Les chapitres suivants s'attacheront à décrire dans un premier temps la caractérisation physico-chimique de cette formulation, puis l'étude de son efficacité *in vitro* sera présentée, ainsi que son optimisation. Enfin, les études d'efficacité *ex vivo* menées seront abordées.

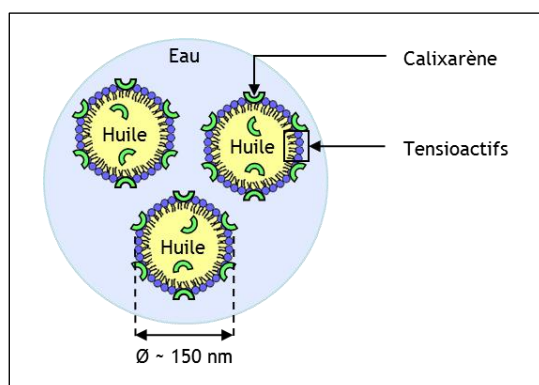


Figure 22 : Représentation schématique de la nanoémulsion de calixarène

4.5. Caractérisation de la nanoémulsion de calix[6]arène

4.5.1. Physico-chimie

La proportion de surfactants choisie permet l'obtention d'une balance hydrophile/lipophile ou HLB optimale (HLB = 11) assurant une meilleure stabilité de l'émulsion sans calixarène. En effet, c'est à cette valeur de HLB qu'ont été observées la plus petite taille de gouttelettes et la distribution de taille, appelée aussi polydispersité (pdl), la plus homogène (Spagnul *et al.* 2010c).

Après incorporation des molécules de calix[6]arène dans la nanoémulsion, une diminution de la taille des particules a été observée (Spagnul *et al.* 2010c), supposant le caractère surfactant du calixarène qui renforce ainsi la stabilité de la nanoémulsion. Il a été également constaté une augmentation de la polydispersité lors de l'accroissement de la quantité de calixarène incorporée dans la formulation, bien que celle-ci, relativement faible (inférieure à 0,25), permette toutefois une distribution de taille des particules homogène. Les gouttelettes, dont le diamètre moyen est d'environ 150 nm, permettent ainsi d'offrir une grande surface qui sera par la suite en contact avec le milieu aqueux contaminant.

Une diminution significative du pH après ajout de calixarène dans la formulation a également été observée lors de sa caractérisation physico-chimique (Spagnul *et al.* 2010c). Ce phénomène peut s'expliquer par la déprotonation des fonctions carboxyliques de la molécule de calixarène, qui confirmerait de surcroît sa présence à l'interface huile/eau de la nanoémulsion comme le schématise la [figure 23](#).

L'hypothèse de cette position interfaciale de la molécule de calixarène a été confirmée à la fois par la mesure du potentiel zêta, qui représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution, mais aussi lors du suivi de la tension interfaciale en présence ou non de calixarène. En effet, les études de Spagnul *et al.* montrent que le potentiel zêta diminue fortement lors de l'ajout progressif de calixarène dans la nanoémulsion, atteignant un minimum de -50 mV à partir de 4 mg.g⁻¹ de calixarène incorporés (Spagnul *et al.* 2010c). Ces observations peuvent être corrélées avec les mesures de pH précédemment décrites, qui suggèrent une déprotonation des molécules de calixarène présentes à la surface des gouttelettes d'huile, conduisant à l'émergence de charges négatives ([Figure 23](#)).

De plus, la réduction du potentiel zêta devrait être un avantage dans la mesure où cela conduit à une meilleure stabilité de la nanoémulsion par augmentation de la répulsion électrostatique entre les gouttelettes d'huiles (Capek 2004). Enfin, la mesure de la tension interfaciale indique une diminution de celle-ci en présence de calixarène dans la phase huileuse, passant de 45 à 17 mN.m⁻¹ à 24 h, et confirmant la tendance des molécules de calixarène à se localiser à l'interface huile/eau, présentant potentiellement ses 3 groupements carboxyliques dans la phase aqueuses. Ces derniers seraient alors disponibles pour la chélation d'ions uranyle (Dei *et al.* 1995, Nostro *et al.* 1996). Cependant, la possibilité que des molécules de

calixarène soient disposées perpendiculairement à la surface des gouttelettes huileuses dispersées n'est pas à exclure. Cette configuration ne constituerait cependant pas un obstacle à la chélation des ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée car, selon des études de modélisation moléculaire, cette chélation peut avoir lieu avec seulement deux des trois fonctions carboxyliques du calixarène et une molécule d'eau (Boulet *et al.* 2006a, 2008; Spagnul 2009). Par ailleurs, il a été démontré que l'ajout de nitrate d'uranyle en excès dans la phase aqueuse ne modifie pas le comportement interfacial de la molécule de calixarène.

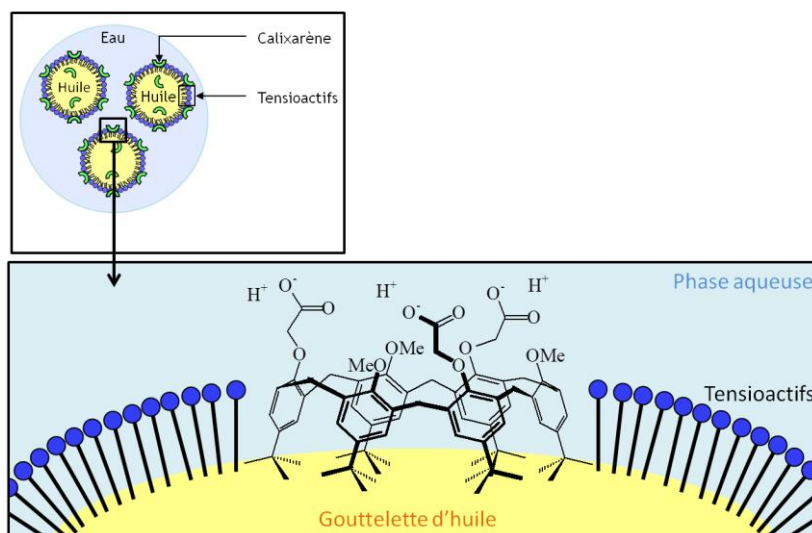


Figure 23 : Illustration schématique de la localisation du calixarène dans la nanoémulsion (Spagnul *et al.* 2010c)

Enfin, l'observation microscopique de nanoémulsions contenant différentes concentrations en calixarène ont permis de constater la présence de cristaux dans la phase aqueuse, probablement de calixarène, à partir d'une concentration en calixarène de 6 mg.g^{-1} , sans modification des mesures de taille, de potentiel zêta ni de pH. Ainsi la présence de ces cristaux ne paraît pas déstabiliser la nanoémulsion durant au minimum 6 mois (Spagnul *et al.* 2010c).

4.5.2. Efficacité *in vitro*

Après avoir caractérisé d'un point de vue physico-chimique la nanoémulsion de calixarène initialement développée pour le traitement de contamination cutanée par l'uranium, de premières études *in vitro* visant à évaluer l'efficacité de chélation de cette formulation ont été menées (Spagnul *et al.* 2010a,c). Pour cela, la nanoémulsion, chargée ou non en calixarène, a été mise en présence d'une phase aqueuse externe contaminée par du nitrate d'uranyle durant 1 h et 4 h, en condition statique ou dynamique. Au terme de ces expérimentations, la nanoémulsion de calixarène (à 2 mg.g^{-1}) a permis l'extraction d'environ 80 et 87 % d'uranium respectivement, en condition statique et dynamique après 1 h de contact, contre 17 et 32 % d'extraction pour la nanoémulsion non chargée. Après contact de la solution de contamination avec une solution de calixarène dans de l'huile de paraffine, seuls 8 % de l'uranium sont extraits en condition

statique contre environ 92 % en condition dynamique (Spagnul *et al.* 2010c). Il apparaît donc que l'huile de paraffine ne constitue pas un bon véhicule pour l'utilisation du calixarène en tant que décontaminant cutanée, puisqu'une application de cette dernière, correspondant aux conditions statiques de l'étude, ne permet pas une extraction efficace de l'uranium.

Bien que les auteurs de l'étude n'abordent pas la forte augmentation d'extraction obtenue en condition dynamique après 1 h de contact, ce résultat peut s'expliquer par la formation sous agitation d'une émulsion, favorisant ainsi la surface de contact des molécules de calixarène avec la phase aqueuse contaminée (Spagnul *et al.* 2010a). Selon des observations non publiées de ces travaux (communication orale par Phan G.), l'émulsion obtenue par agitation de la solution d'huile de paraffine contenant uniquement les molécules de calixarène ne présente pas une bonne stabilité dans le temps. Les mêmes tendances ont été obtenues après un temps de contact de 4 h (Spagnul *et al.* 2010a). Ces études démontrent, d'une part, l'efficacité de décontamination propre à la nanoémulsion non chargée, qui peut s'expliquer soit par la présence des groupements oxygénés sur les tensioactifs non ioniques pouvant interagir avec les ions uranyle, ou bien par la présence de micelles de surfactants qui seraient capables de piéger l'uranium (Das & Ganguly 1996, Moulin *et al.* 1993), mais qui constituent des systèmes non spécifiques d'extraction de l'uranium depuis une solution aqueuse contaminée. D'autre part, l'augmentation de l'efficacité d'extraction de l'uranium par la présence de calixarène au sein de la formulation développée confirme sa spécificité et sa disponibilité à l'interface huile/eau de la nanoémulsion.

4.5.3. Optimisation de l'efficacité d'extraction *in vitro*

Suite à ces premiers résultats prometteurs, une optimisation de la formulation a été menée afin qu'elle présente une efficacité optimale d'extraction des ions uranyle *in vitro* (Spagnul *et al.* 2010a). Ainsi les études menées ont permis d'établir une relation entre l'efficacité d'extraction de la nanoémulsion de calixarène et différents paramètres tels que :

- le temps de contact entre la nanoémulsion de calixarène et la solution de contamination
- le ratio molaire calixarène / uranium
- le ratio volumique entre la nanoémulsion de calixarène et la solution de contamination
- la variation du pH de la solution de contamination

L'effet de ces différents paramètres va maintenant être présenté.

Variation du temps de contact

Dans les études menées par Spagnul *et al.*, une nanoémulsion de calixarène à 2 mg.g^{-1} a été mise en contact avec une solution de contamination de nitrate d'uranyle entre 5 min et 4 h. Dès 5 min de contact, l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène est optimale dans les conditions de l'étude puisqu'elle a permis une extraction d'environ 83 % et 91 % respectivement en conditions statique et dynamique (Spagnul *et al.* 2010a).

Ratio molaire calixarène / uranium

L'effet du ratio molaire calixarène / uranium sur l'efficacité de chélation a été étudié, d'une part en faisant varier la concentration en calixarène au sein de la nanoémulsion, d'autre part en faisant varier la concentration en uranium de la solution contaminante. Il a ainsi été observé que, pour une concentration constante à 25 mg.L^{-1} d'uranium dans la solution de contamination, la capacité d'extraction de la nanoémulsion de calixarène passait pratiquement du simple au double pour une concentration en calixarène respectivement de 2 et 4 mg.g^{-1} . Au-delà, l'efficacité ne semblait pas pouvoir être améliorée. Dans le cas où la concentration en calixarène a été fixée à 2 mg.g^{-1} au sein de la formulation, l'extraction de l'uranium a semblé être optimale (80 %) jusqu'au ratio de 32, correspondant à une concentration de $12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ d'uranium. Au vu de ces résultats, les auteurs ont choisi par la suite de se mettre dans des conditions optimales permettant d'obtenir des extractions significatives, et pour cela ont choisi de garder un ratio molaire de 10 000 (Spagnul *et al.* 2010a).

Ratio volumique nanoémulsion de calixarène / solution de contamination

En cas de contamination cutanée, le volume de la solution contaminante devrait être plus faible que celui de la nanoémulsion de calixarène. Pour connaître les limites d'efficacité de la nanoémulsion de calixarène à

2 mg.g⁻¹, Spagnul *et al.* ont fait varier le volume de la solution de contamination, afin que celui-ci soit jusqu'à 10 fois moins important que celui de la nanoémulsion de calixarène, tout en gardant un ratio molaire calixarène / uranium de 10 000 comme précisé auparavant. Il a ainsi été constaté que la réduction du volume de la solution de contamination entraîne une légère diminution de l'efficacité d'extraction de la nanoémulsion de calixarène en passant d'environ 87 à 76 % en condition dynamique et de 80 à 62 % en condition statique. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs suggèrent une moins bonne homogénéisation notamment en condition statique lorsque le volume de la solution de contamination est faible. Il est cependant remarquable que le taux d'extraction reste relativement élevé, et pourrait potentiellement permettre de prévenir le passage de l'uranium au travers de la peau (Spagnul *et al.* 2010a).

Variation du pH de la solution de contamination

Enfin, l'étude de la variation du pH de la solution de contamination (sur une gamme de 2 à 5) sur l'efficacité de chélation de la nanoémulsion de calixarène a été étudiée, tout en gardant un ratio molaire calixarène / uranium de 10 000. Il a alors été constaté une très forte diminution d'extraction de l'uranium par la nanoémulsion de calixarène à 2 mg.g⁻¹, passant d'environ 93 à 11 % en condition dynamique et de 80 à 10 % en condition statique lorsque le pH de la solution de contamination passait de 5 à 2. Il semblerait donc que la protonation des groupements hydroxyle soit suffisamment importante pour des valeurs de pH inférieures à 3 pour limiter la chélation de l'uranium. Des essais similaires ont ensuite été menés en utilisant cette fois une nanoémulsion formulée avec du tampon acétate à pH 5 en guise de phase aqueuse, ce qui n'affecte en rien les principales propriétés physico-chimiques de celle-ci (taille, potentiel zêta, pH et stabilité sur 6 mois). Les résultats obtenus démontrent que cette formulation tamponnée a permis d'une part de conserver son efficacité d'extraction (87 %) en condition statique à pH 5, et d'autre part d'obtenir une bien meilleure efficacité en milieu acide (pH 2) avec une extraction d'environ 66 % d'uranium, contre les 10 % obtenus précédemment (Spagnul *et al.* 2010a).

En résumé, d'après les études *in vitro* menées par Spagnul *et al.* (Spagnul *et al.* 2010a,c), la nanoémulsion de calixarène développée paraît très prometteuse dans le cadre de son utilisation topique en tant que décontaminant cutané. En effet, elle permet, dans les conditions expérimentales décrites ci-avant, une action chélatante spécifique très rapide. De plus, cette efficacité est maintenue même après contact avec de très faible volume de contamination. Le pH de la solution contaminée reste cependant le paramètre affectant le plus l'action de la nanoémulsion de calixarène, puisqu'en deçà d'un certain pH, son efficacité diminue fortement. L'influence de l'acidification du milieu contaminant peut cependant être minimisée par l'utilisation d'une nanoémulsion tamponnée à pH 5, pH qui de surcroît respectera l'intégrité de la peau, dont le pH à sa surface se situe entre 4,2 et 5,8. Enfin, la concentration optimale de calixarène dans la nanoémulsion paraît se situer à 4 mg.g⁻¹.

4.5.4. Efficacité *ex vivo*

Afin de confirmer ces observations *in vitro*, l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène (à 4 mg.g⁻¹) a également été évaluée *ex vivo* (Spagnul *et al.* 2010b, 2011), en cellule de diffusion transdermique de Franz durant 24 h (§ 3.2.1.1), sur des peaux provenant d'oreille de porc, connues pour être le modèle le plus représentatif de la peau humaine (§ 3.2.1.2). La contamination des explants a été réalisée par une solution de nitrate d'uranyle à 10 mg.L⁻¹, forme soluble et transférable de l'uranium, identifiée comme étant celle diffusant le plus rapidement et le plus fortement au travers de la peau (De Rey *et al.* 1983), et donc la plus préoccupante en cas de contamination cutanée. Dans le cadre de ces études, le ratio calixarène / uranium est de 80, permettant ainsi d'être en excès de calixarène afin de vérifier son efficacité.

Après contamination sur peau intacte, bien que la diffusion transcutanée de l'uranium soit faible de par la barrière protectrice que forme la couche cornée (§ 3.3.1), une diminution significative de 98 % du passage de l'uranium au travers de la peau a été observée après application immédiate de la nanoémulsion de calixarène. Dans le cas d'une contamination sur peau excoriée, du fait de l'absence de couche cornée, le passage de l'uranium est bien plus élevé, mais celui-ci se voit également diminué de manière significative (environ 98 %) après application de la formulation de calixarène (Spagnul *et al.* 2010b). Notons que lors de ces expérimentations, la diffusion de l'uranium après traitement des peaux par la nanoémulsion de calixarène est comparée à des peaux contaminées non traitées. L'efficacité calculée prend donc également en compte l'effet de dilution qui permet, selon la loi de Fick (§ 3.1.2), de diminuer le passage de l'uranium au travers de la peau. Malgré cet effet de dilution, la diminution du passage due au traitement reste significative.

Des études complémentaires similaires ont ensuite comparé les traitements par la nanoémulsion avec et sans calixarène (Spagnul *et al.* 2011), et ont démontré une efficacité de décontamination significative de la formulation contenant du calixarène dès 30 min après application sur peau excoriée contaminée. 4 h après contamination et traitement, le passage transcutané de l'uranium s'est vu diminuer de 4 à 36 fois après application respective de la nanoémulsion non chargée et chargée.

Contrairement aux études précédentes, l'effet de dilution a également été pris en compte et indique une diminution de moitié du passage transcutané de l'uranium après traitement par de l'eau sur peau excoriée, au terme des 24 h d'étude. De plus, lors de traitements différés de 5, 15 et 30 min après la contamination des explants de peau, la cinétique de diffusion de l'uranium obtenue est sensiblement la même au terme de 24 h d'expérimentation. Les auteurs supposent donc qu'une partie de l'uranium déposé pénètre très rapidement dans les premières couches de la peau excoriée, pour diffuser ensuite passivement au travers de la peau et rejoindre le compartiment receveur.

Enfin, il est intéressant de noter l'absence de détection de calixarène dans le compartiment receveur après application des formulations durant 24 h sur les explants de peau de porc montés en cellule de Franz (Spagnul *et al.* 2011), indiquant l'absence potentielle de passage du calixarène libre ou complexé à l'uranium au travers de la peau, ou tout du moins en quantité extrêmement faible et non détectable par la technique employée. Ainsi moins de 0,01 % de la quantité de calixarène déposée (limite de détection de l'appareil de chromatographie liquide à haute performance utilisé) peut avoir traversé la peau intacte et excoriée, cette quantité étant relativement négligeable.

D'après les études décrites ci-avant, la nanoémulsion de calixarène paraît être un système prometteur dans le cadre de son utilisation en tant que décontaminant cutané après contamination par du nitrate d'uranyle, une des formes les plus transférables et les plus préoccupantes de l'uranium. Ce traitement, à réaliser le plus rapidement possible après contamination, pourrait constituer un dispositif médical pour le traitement d'urgence des contaminations cutanées à l'uranium, potentiellement utilisable directement par les travailleurs de l'industrie nucléaire en cas d'accident de contamination, en attendant l'arrivée du corps médical pour une prise en charge ultérieure.

4.5.5. Formulations dérivées

Afin de faciliter l'application de cette nanoémulsion de calixarène sur des zones à traiter particulières telles que le cuir chevelu ou des peaux présentant des lésions importantes, des études complémentaires ont été réalisées, et ont conduit à l'élaboration d'une forme lavante (Phan *et al.* 2013) et d'une forme gélifiante (Belhomme-Henry *et al.* 2014).

Ainsi, d'après les premières études menées *ex vivo* en cellules de Franz (Phan *et al.* 2013), le calixarène incorporé dans une forme galénique de type shampooing (émulsion H/E) conserve son efficacité de chélation avec une diminution du passage transcutané de l'uranium d'environ 80 % sur peau de porc excoriée, contre 50 et 55 % respectivement après application d'une solution de DTPA et d'EHBP, qui sont les molécules chélatantes de références actuellement employées dans le cadre de la décontamination cutanée. Ces dernières ne paraissent cependant pas adaptées à la décontamination spécifique de l'uranium, puisqu'une efficacité similaire est obtenue par simple dilution de la contamination par de l'eau. Il serait intéressant que des études complémentaires d'efficacité soient maintenant menées sur un modèle représentant le cuir chevelu afin d'étudier la plus-value de cette forme lavante.

Le développement d'une forme thermo-gélifiante a également été proposé (Belhomme-Henry *et al.* 2014) pour une application optimale de la nanoémulsion sur peaux lésées. Cet hydrogel, consistant en l'ajout d'une combinaison de poloxamer (pluronic) avec du méthyl cellulose (MC) ou de l'hydroxypropylméthyl cellulose (HPMC) dans la nanoémulsion, permet d'obtenir une forme galénique fluide à basse température, et se gélifiant à 32°C, température cutanée externe. Malgré les changements rhéologiques de la

nanoémulsion, ses caractéristiques physico-chimiques restent inchangées (taille, potentiel zêta, aspect macroscopique). D'après ces études *in vitro*, l'efficacité d'extraction de la nanoémulsion est conservée après ajout de gélifiant, quel qu'il soit. De plus, les études d'efficacité de décontamination menées *ex vivo* en cellules de Franz sur des explants d'oreille de porc excoriés démontrent que la diffusion des ions uranyle ne dépassent pas 5 % lors de traitement par les formulations gélifiantes. Enfin, l'efficacité de chélation de la nanoémulsion de calixarène est d'autant plus renforcée par l'application des formulations texturantes, l'uranium n'étant pas détecté avant 30 min après contamination dans le compartiment receveur. Ce phénomène peut s'expliquer par la rétention non spécifique de l'uranium qui pourrait alors subir une absorption physique au sein du dispositif comme cela a été décrit dans le chapitre 3.4.2.2.

L'ensemble des études portant sur l'utilisation du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène en tant qu'agent chélatant spécifique de l'uranium incorporé dans des formulations galéniques à usage topique sont donc très prometteuses dans le cadre de la décontamination cutanée. En effet, la nanoémulsion de calixarène, à la base du développement de toute autre formulation, démontre une efficacité d'extraction rapide et spécifique de l'uranium sur peau intacte et excoriée. Son utilisation en tant que traitement d'urgence pourrait donc être envisagée afin de combler l'absence de dispositifs mis à disposition des travailleurs en cas de contamination accidentelle.

C'est dans cet objectif que ce sujet de thèse s'intéresse à l'étude plus approfondie de l'efficacité de décontamination de cette nanoémulsion de calixarène tant sur des peaux intactes que sur des peaux présentant diverses lésions superficielles telles que des coupures ou des piqûres pouvant potentiellement entraîner une augmentation de l'incorporation du radiocontaminant. Ces études, menées en partie sur des explants d'oreilles de porc montés en cellules de Franz, ont également été réalisées chez le rat. De plus, l'importance de l'innocuité cutanée de la formulation devait également être un facteur à prendre en compte. C'est pourquoi un second volet de cette étude s'est attaché à vérifier l'absence de phénomène d'irritation cutanée après application de cette nanoémulsion de calixarène sur des modèles d'épiderme humain reconstitué *in vitro* en culture tissulaire.

Références – Chapitre I

- Abergel RJ, Durbin PW, Kullgren B, Ebbe SN, Xu J, *et al.* 2010. Biomimetic actinide chelators: an update on the preclinical development of the orally active hydroxypyridonate decorporation agents 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2-HOPO). *Health Phys.* 99(3):401–7
- Adloff JP, Genet M. 2001. L'uranium, un peu d'histoire. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 1–6. EDP Sciences
- Ansoborlo E, Chiappini R, Moulin V. 2003. La spéciation dans l'environnement et en milieu biologique. *Clefs CEA n°48*
- Ansoborlo E, Moulin V, Cossonet C, Bion L, Ménétrier F, *et al.* 2002. *La Spéciation de L'uranium Dans Le Domaine de La Toxicologie Nucléaire : Milieux Environnementaux et Biologiques. GT 32 Spéciation*
- Ansoborlo É, Amekraz B, Moulin C, Moulin V, Taran F, *et al.* 2007. Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chim.* 10(10-11):1010–19
- Araki K, Hashimoto N, Otsuka H, Nagasaki T, Shinkai S. 1993. Molecular Design of a Calix(6)arene-Based Super-Uranophile with C3 Symmetry. High UO₂²⁺ Selectivity in Solvent Extraction. *Chem. Lett.*, pp. 829–32
- Archimbaud M, Henge-Napoli MH, Lilienbaum D, Desloges M, Montagne C. 1994. Application of calixarenes for the decorporation of uranium: Present limitations and further trends. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 53(1-4):327–30
- Arfsten DP, Schaeffer DJ, Johnson EW, Robert Cunningham J, Still KR, Wilfong ER. 2006. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ. Res.* 100(2):205–15
- ASN. 2008. *Guide National - Intervention Médicale En Cas D'événement Nucléaire Ou Radiologique*, Vol. 3.6. Paris: ASN
- Assemblée générale de l'association Médicale Mondiale. 2013. Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects
- Baglan N, Cossonet C, Trompier F, Ritt J, Bérard P. 1999. Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys.* 77(4):455–61
- Baglan N, Dinse C, Cossonet C. 1997. Investigation of U (VI) extraction with calixarene: Application to analysis of urine sample. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 226:261–65
- Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW, F. Eckerman K, W. Townsend L. 2003. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosim.* 105(1-4):509–12
- Bartek MJM, Labudde JJA, Maibach HIH. 1972. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J. Invest. Dermatol.* 58(3):114–23
- Belhomme-Henry C, Phan G, Huang N, Bouvier C, Rebière F, *et al.* 2014. Texturing formulations for uranium skin decontamination. *Pharm. Dev. Technol.* 19(6):692–701
- Bérard P, Michel X, Menetrier F, Laroche P, Bérard P. 2010. Medical management of a cutaneous contamination. *Health Phys.* 99(4):572–76

- Bérard P, Quesne B, Auriol B, Chalabreysse J. 1994a. Cutaneous contamination after a uranyl nitrate skin burn: incident report. *Radiat. Prot. Dosimetry*
- Bérard P, Quesne B, Auriol B, Chalabreysse J. 1994b. Cutaneous contamination after a uranyl nitrate skin burn: Incident report. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 53(1-4):269–72
- Bernard SR, Struxness EG, Laboratory ORN. 1957. *A Study of the Distribution and Excretion of Uranium in Man: An Interim Report*
- Bhattacharyya MH, Breitenstein BD, Métivier H, Muggenburg BA, Stradling GN, Volf V. 1995. *Traitement de La Contamination Interne Accidentelle Des Travailleurs*
- Blanchin N, Desloires S, Grappin L, Guillermin AM, Lafon P, et al. 2004. Protocoles de prise en charge des incidents d'expositions internes au plutonium dans un service médical d'installation nucléaire de base : élaboration - mise en place - évaluation - validation de 1996 à 2002. *Radioprotection*. 39(1):59–75
- Bleise A, Danesi PR, Burkart W. 2003. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J. Environ. Radioact.* 64(2-3):93–112
- Bonin B, Blanc PL. 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 7–41. EDP Sciences
- Boulet B, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Cote G, Bouvier-Capely C. 2006a. Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extr. Ion Exch.* 24(3):319–30
- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. 2006b. A combined experimental and theoretical study on the conformational behavior of a calix arene. *J. Phys. Chem. A*. 110(17):5782–91
- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. 2008. Theoretical study of the uranyl complexation by hydroxamic and carboxylic acid groups. *Inorg. Chem.* 47(18):7983–91
- Bouquin B, Calmet D, Flüry-Hérard A, Jimonet C, Manaud N, et al. 2003. Toxicologie radiologique et chimique. *Clefs CEA n°48*
- Bouvier-Capely C, Manoury A, Legrand A, Bonthonneau JP, Cuenot F, Rebière F. 2009. The use of calix[6]arene molecules for actinides analysis in urine and drinking water: An alternative to current procedures. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 282(2):611–15
- Bozal CB, Martinez a B, Cabrini RL, Ubios a M. 2005. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) on endochondral ossification lesions induced by a lethal oral dose of uranyl nitrate. *Arch. Toxicol.* 79(8):475–81
- Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. 2002. Methods for studying percutaneous absorption. In *Dermatological and Transdermal Formulations - Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, pp. Vol. 119, 197–270
- Bronaugh R, Hood H, Kraeling M, Yourick J. 1999. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In *Drugs and the Pharmaceutical Sciences - Percutaneous Absorption*, pp. Vol. 97, 229–234
- Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER. 1982a. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62(3):481–88

- Bronaugh RL, Stewart RF, Congdon ER, Giles AL. 1982b. Methods for in vitro percutaneous absorption studies I. Comparison with in vivo results. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 62(3):474–80
- Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. 1986. Methods for in vitro percutaneous absorption studies. VII: Use of excised human skin. *J. Pharm. Sci.* 75(11):1094–97
- Capek I. 2004. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 107(2-3):125–55
- Cazoulat A, Bérard P, Laroche P. 2012. Risques liés à l'uranium appauvri en isotope 235. *Pathol. Prof. l'environnement.* 7(3):1–9
- Challapalli PVN, Stinchcomb AL. 2002. In vitro experiment optimization for measuring tetrahydrocannabinol skin permeation. *Int. J. Pharm.* 241(2):329–39
- Clément P, Laugel C, Marty J-PP. 2000. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. *J. Control. Release.* 66(2-3):243–54
- Coleman AW, Jebors S, Cecillon S, Perret P, Garin D, *et al.* 2008. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New J. Chem.* 32(5):780
- Cronin MTD, Dearden JC, Moss GP, Murray-Dickson G. 1999. Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships. *Eur. J. Pharm. Sci.* 7(4):325–30
- Da Silva E, Lazar AN, Coleman AW. 2004a. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 14(1):3–20
- Da Silva E, Shahgaldian P, Coleman AW. 2004b. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. *Int. J. Pharm.* 273(1-2):57–62
- Das S, Ganguly BN. 1996. Study of Triton X-100 surfactant-UO 2+ 2 aqueous system by positron annihilation technique. *Radiat. Phys. Chem.* 47(2):257–62
- De La Vaissière C, Laberrigue J, Sacquin Y, Hubaut F, Audi G. 2007. *La radioactivité.com*. http://www.laradioactivite.com/fr/site/pages/Cycle_Combustible_Nucleaire.htm
- De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. 1983. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environ. Res.* 30(2):480–91
- Dei L, Casnati A, Nostro P, Baglioni P. 1995. Selective Complexation by p-tert-Butylcalix arene in Monolayers at the Water-Air Interface. *Langmuir*
- Delacroix D, Guerre JP, Leblanc P. 2006. *Guide Pratique Radionucléides et Radioprotection(2^{ème} édition). Manuel pour la manipulation de substances radioactives dans les laboratoires de faible et moyenne activité.* EDP sciences.
- Diamond G. 1989. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam. Appl. Toxicol.* 13(1):65–78
- Dias M, Farinha A, Faustino E, Hadgraft J, Pais J, Toscano C. 1999. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *Int. J. Pharm.* 182(1):41–47

- Dibama HM, Clarot I, Fontanay S, Salem A Ben, Mourer M, *et al.* 2009. Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(10):2679–82
- Dinse C, Baglan N, Cossonnet C, Bouvier C. 2000. New purification protocol for actinide measurement in excreta based on calixarene chemistry. *Appl. Radiat. Isot.* 53(1-2):381–86
- Dinse C, Cossonnet C, Baglan N, Asfari Z, Vicens J. 1997. Extraction sélective des actinides : application à l'analyse radiotoxicologique. *Radioprotection.* 32(5):659–71
- Domingo JL. 2001. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod. Toxicol.* 15(6):603–9
- Domingo JL, Paternain JL, Llobet JM, Corbella J. 1989. The developmental toxicity of uranium in mice. *Toxicology.* 55(1-2):143–52
- Dublineau I, Petitot F, Lestaevel P, Mabondzo A. 2009. Transfert à travers les barrières épithéliales et cérébrales. In *Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine*, pp. 133–52
- Durbin PW. 2008. Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health Phys.* 95(5):465–92
- Durbin PW, Kullgren B, Xu J, Raymond KN. 1998. Development of Decorporation Agents for the Actinides. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 79(1-4):433–43
- Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B. 2006. Para-tertio-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations, French Patent
- EDF. 2013. www.edf.com
- El Maghraby GM, Barry BW, Williams a C. 2008. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34(4-5):203–22
- Feldstein MM, Raigorodskii IM, Iordanskii AL, Hadgraft J. 1998. Modeling of percutaneous drug transport in vitro using skin-imitating Carbosil membrane. *J. Control. Release.* 52(1-2):25–40
- Franz TJ. 1975. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *J. Invest. Dermatol.* 64(3):190–95
- Fukuda S, Iida H, Ikeda M, Yan X, Xie Y. 2005. Toxicity of uranium and the removal effects of CBMIDA and EHBP in simulated wounds of rats. *Heal. Phys.* 89(1):81–88
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. 2006. Effects of pH on DU intake and removal by CBMIDA and EHBP. *Health Phys.* 92(1):10–14
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. 2009a. Acute toxicity of subcutaneously administered depleted uranium and the effects of CBMIDA in the simulated wounds of rats. *Health Phys.* 96(4):483–92

- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. 2009b. Efficacy of oral and intraperitoneal administration of CBMIDA for removing uranium in rats after parenteral injections of depleted uranium. *Radiat Prot Dosim.* 133(1):12–19
- Garnier-Laplace J, Colle C, Morello M. 2001. Uranium naturel et environnement. *Fiche radionucléide Environ.*
- Geinoz S, Rey S, Boss G, Bunge AL, Guy RH, *et al.* 2002. Quantitative structure - Permeation relationships for solute transport across silicone membranes. *Pharm. Res.* 19(11):1622–29
- Gerber GB, Thomas RG. 1992. Introduction to the Guidebook for the Treatment of Accidental Internal Radionuclide Contamination of Workers. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 41(1):3
- Gilbin R, Ansoborlo E, Martin-Garin A, Frelon S, Moulin C, Floriani M. 2009. Eléments du cycle biogéochimique, spéciation et biodisponibilité élémentaire - approche théorique et analytique. In *Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine*
- Godin B, Touitou E. 2007. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59(11):1152–61
- Grappin L, Bérard P, Menetrier F, Carbone L, Courtay C, *et al.* 2007a. Treatment of actinide exposures: A review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 127(1-4):435–39
- Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, Carbone L, Courtay C, *et al.* 2007b. Exposure to actinides : report on Ca-DTPA injections in CEA-AREVA centres. *Radioprotection.* 42:163–96
- Griffiths NM, Wilk JC, Abram MC, Renault D, Chau Q, *et al.* 2012. Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys.* 103(2):187–94
- Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. 2011. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(4):352–66
- Gutsche C. 1989. *Calixarenes*. The Royal Society of Chemistry
- Hadgraft J. 2001. Skin, the final frontier. *Int. J. Pharm.* 224(1-2):1–18
- Hadgraft J. 2004. Skin deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58(2):291–99
- Hadgraft J, Lane ME. 2005. Skin permeation: The years of enlightenment. *Int. J. Pharm.* 305(1-2):2–12
- Haigh JM, Smith EW. 1994. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2(5-6):311–30
- Henge Napoli MH, L'azou B, Bérard P, Cambar J. 2001. Toxicité de l'uranium. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 239–60. EDP Sciences
- Henge-Napoli MH, Ansoborlo E, Chazel V, Houpert P, Paquet F, Gourmelon P. 1999. Efficacy of ethane-1-hydroxy-1, 1-bisphosphonate (EHBP) for the decorporation of uranium after intramuscular contamination in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 75(11):1473–77

- Henge-Napoli MH, Archimbaud M, Ansoborlo E, Metivier H, Gourmelon P. 1995. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing the retention of uranium in rat after acute administration. *Int. J. Radiat. Biol.* 68(4):389–93
- Hengé-Napoli MH, Ansoborlo E, Houpert P, Mirto H, Paquet F, *et al.* 1998. Progress and Trends in In Vivo Chelation of Uranium. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 79(1):449–52
- Houk J, Guy RH. 1988. Membrane models for skin penetration studies. *Chem. Rev.* 88(3):455–72
- Houpert P, Chazel V, Paquet F. 2004. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 82(2):73–78
- Houpert P, Chazel V, Paquet F, Bailly T, Burgada R, Henge-Napoli MH. 2001. Reduction of uranium transfer by local chelation in simulated wounds in rats. *Hum Exp Toxicol.* 20(5):237–41
- Houpert P, Lestaevel P, Bussy C, Paquet F, Gourmelon P. 2005. Enriched but not depleted uranium affects central nervous system in long-term exposed rat. *Neurotoxicology.* 26(6):1015–20
- Houpert P, Muller D, Chazel V, Claraz M, Paquet F. 2003. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 105(1-4):517–20
- Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings J, Hoeck U, *et al.* 1996. Methods for assessing percutaneous absorption: The report and recommendations of ECVAM workshop 13. *Atla-Alternatives Lab. Anim.* 24(1):81–106
- Howland J. 1949. Studies on human exposure to uranium compounds. In *Pharmacology and Toxicology of Uranium*, ed. McGraw-Hill Book Company, pp. 993–1017. New York
- IAEA. 1996. *Assessment and Treatment of External and Internal Radionuclide Contamination*, Vol. IAEA-TECDO
- IAEA E. 2005. Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency. *EPR-MEDICAL, Vienna: IAEA-WHO*
- ICRP. 1959. *Permissible Dose for Internal Radiation*. ICRP-2nd ed.
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, *et al.* 2007. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Ski. Res. Technol.* 13(1):19–24
- Kathren RL, Burklin RK. 2008. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys.* 94(2):170–79
- Kullgren B, Jarvis EE, An DD, Abergel RJ. 2013. Actinide chelation: biodistribution and in vivo complex stability of the targeted metal ions. *Toxicol. Mech. Methods.* 23(1):18–26
- Larousse.fr. *Coupe de l'épiderme*. http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Coupe_de_lépiderme/1003518
- Le Perchec P. 2014. *Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection*. CNRS, SagaScience. <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/decouv/peau/index.html>
- Leggett RW, Pellmar TC. 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J. Environ. Radioact.* 64(2-3):205–25

- Lestaevel P, Houpert P, Bussy C, Dhieux B, Gourmelon P, Paquet F. 2005. The brain is a target organ after acute exposure to depleted uranium. *Toxicology*. 212(2-3):219–26
- Levin J, Maibach H. 2005. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *J. Control. Release*. 103(2):291–99
- Liu W, Sun D, Li C, Liu Q, Xu J. 2006. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *J. Colloid Interface Sci*. 303(2):557–63
- Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL. 2000. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Heal. Phys*. 78(4):434–37
- Madic C, Genet M. 2001. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 43–81. EDP Sciences
- Martini M-C. 2006. *Introduction À La Dermopharmacie et À La Cosmétologie*. Ed. Lavoisier (2^{ème} édition).
- Métivier H, Ansoborlo E, Chazel V, Gerasimo P. 2001. Biocinétique de dosimétrie des expositions à l'uranium. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 213–38. EDP Sciences
- Moody RP, Maibach HI. 2006. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food Chem. Toxicol*. 44(11):1783–88
- Morimoto Y, Hatanaka T, Sugibayashi K, Omiya H. 1992. Prediction of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.*, pp. 634–39
- Moulin C, Reiller P, Beaucaire C, Lemordant D. 1993. Time-resolved laser-induced spectrofluorometry for the study of uranium-anionic surfactant micelle interactions. *J. Colloid Interface Sci*.
- Muller D, Houpert P. 2006. Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux: le DTPA et l'uranium. *Radioprotection*. 41(4):413–20
- Muller D, Houpert P, Henge-Napoli MH, Metivier H, Paquet F. 2006. Potential synergy between two renal toxicants: DTPA and uranium. *Radioprotection*. 41(4):413–20
- Netzlaff F, Kaca M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Meiers P, *et al.* 2007. Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 66(1):127–34
- Nostro P, Casnati A, Bossoletti L. 1996. Complexation properties of calixarenes in Langmuir films at the water-air interface. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp*. 116:203–9
- Nuclear-Forensics. *Decay chains*. [http://metadata.berkeley.edu/nuclear-forensics/Decay Chains.html](http://metadata.berkeley.edu/nuclear-forensics/Decay%20Chains.html)
- OECD/OCDE-427. 2004. Absorption cutanée : méthode in vivo. *Lignes directrices l'OCDE pour les essais Prod. Chim*.
- OECD/OCDE-428. 2004. Absorption cutanée : méthode in vitro. *Lignes directrices l'OCDE pour les essais Prod. Chim*.
- Ortega A, Domingo JL, Gómez M, Corbella J. 1989. Treatment of experimental acute uranium poisoning by chelating agents. *Pharmacol. Toxicol*. 64(3):247–51

- Ozmen M, Yurekli M. 1998. Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 6(2):111–15
- Paquet F, Adam-Guillermin C, Ansoborlo E, Beaugelin-Seiller K, Carrière M, *et al.* 2009. Uranium. In *Toxicologie Nucléaire Environnementale et Humaine*, pp. 411–43
- Paquet F, Ramounet B. 1998. In vitro experiments to determine the mechanisms by which chelators remove neptunium and uranium from the body. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 79:467–70
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejnik JW, Hamilton M, Hogan J, *et al.* 1999. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. *Toxicol. Sci.* 49(1):29–39
- Petitot F. 2010. Prise en charge des plaies contaminées par l'uranium - Rapport DRPH/SRBE n°2010/3. IRSN
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, *et al.* 2007a. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Heal. Phys.* 92(5):464–74
- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. 2007b. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat Prot Dosim.* 127(1-4):125–30
- Petitot F, Moreels AM, Paquet F. 2004. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 82(2):133–39
- Petitot F, Moreels A-MM, Paquet F. 2010. Evolution of the percutaneous penetration and distribution of uranyl nitrate as a function of skin-barrier integrity: An in vitro assessment. *Drug Chem. Toxicol.* 33(3):316–24
- Phan G, Semili N, Bouvier-Capely C, Landon G, Mekhloufi G, *et al.* 2013. Calixarene cleansing formulation for uranium skin contamination. *Health Phys.* 105(4):382–89
- Poriol L, Boulet B, Cossonnet C, Romes B, Mesures E. 2007. Study of the U/Am separation with supported calix[6]arene in the aim of urinary actinides analysis. . 127(1):273–76
- Rana S, Sharma N, Ojha H, Shivkumar HG, Sultana S, Sharma RK. 2014. p-Tertbutylcalix[4]arene nanoemulsion: preparation, characterization and comparative evaluation of its decontamination efficacy against Technetium-99m, Iodine-131 and Thallium-201. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 117:114–21
- Ravenzwaay B va., Leibold E. 2004. A comparison between in vitro rat and human and in vivo rat skin absorption studies. *Hum. Exp. Toxicol.* 23(9):421–30
- Rheinwald JG, Green H. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 6(3):331–43
- Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. 2002. *Skin Transport.* Marcel Dekker. <http://fr.scribd.com/doc/133798666/04-Skin-Transport>
- Rodik R, Boyko V, Kalchenko V. 2009. Calixarenes in bio-medical researches. *Curr. Med. Chem.* 380(li):1630–55
- Rojas-Palma C, Liland A, Naess Jerstad A, Etherington G, Del Rosario Pérez M, *et al.* 2009. *TMT Handbook: Triage, Monitoring and Treatment of People Exposed to Ionising Radiation Following a Malevolent Act*

- Sánchez DJ, Bellés M, Albina ML, Gómez M, Linares V, Domingo JL. 2006. Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology*. 228(2-3):323–32
- SCCS. 2010. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. *Sci. Comm. Consum. Saf.*
- Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, Düsing H-J, Gamer A, *et al.* 2008. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *Altern. Lab. Anim.* 36(2):161–87
- Shah VP, Elkins J, Lam S-Y, Skelly JP. 1989. Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. *Int. J. Pharm.* 53(1):53–59
- Sharma D, Kamboj S, Nair AB, Ali J. 2010. Nuclear and radiological agents: Contamination and decontamination of human beings. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 5(3):95–101
- Shinkai S, Koreishi H, Ueda K, Manabe O. 1986. A new hexacarboxylate uranophile derived from calix[6]arene. *J. Chem. Soc.* 3(233-4):
- Simon GA, Maibach HI. 2000. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations-an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13(5):229–34
- Souidi M, Tissandie E, Racine R, Ben Soussan H, Rouas C, *et al.* 2009. Uranium: Properties and biological effects after internal contamination. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 67(1):23–38
- Spagnul A. 2009. *Développement d'une forme pharmaceutique véhiculant un calixarène destinée au traitement d'une peau saine ou lésée contaminée par de l'uranium*. Université Paris-Sud 11
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Adam M, Phan G, Rebière F, Fattal E. 2010a. Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* 398(1-2):179–84
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Landon G, Tessier C, *et al.* 2011. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79(2):258–67
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. 2010b. A new formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination. *Health Phys.* 99(3):430–34
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. 2010c. Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *J. Pharm. Sci.* 99(3):1375–83
- Taylor DM, Thompson RC, Masse R, Moskalev YI, Smith H, Sullivan MF. 1986. *The Metabolism of Plutonium and Related Elements*. ICRP Publication 48. Ann. ICRP ed.
- Tazart A, Bérard P, Leiterer A, Ménétrier F. 2013. Decontamination of radionuclides from skin: an overview. *Health Phys.* 105(2):201–7
- Thieriot S. 2014. *La fission nucléaire*. <http://www.fissionnucleaire.toile-libre.org/index.html>

- Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D, Tymen, P. Gerasimo, D. Hoffschir H. 2000a. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol.* 76(10):1417–24
- Tymen H, Hoffschir D, Gerasimo P, Marty J-P. 2000b. Efficiency of etidronic acid in the case of cutaneous radiocontamination by actinid elements: in vitro evaluation. *Ann. Pharm. Fr.* 58(6):405–13
- Ubios A, Braun E, Cabrini R. 1994. Lethality due to uranium poisoning is prevented by ethane-1-hydroxy-1, 1-biphosphonate (EHBP). *Health Phys.* 66(5):540–44
- Ubios A, Braun E, Cabrini R. 1998. Effect of biophosphonates on abnormal mandibular growth of rats intoxicated with Uranium. *Health Phys.* 75(6):610–13
- Ubios AM, Marzorati M, Cabrini RL. 1997. Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Phys.* 72(5):713–15
- Viala M. 2001. Utilisation industrielle de l'uranium. In *L'uranium de L'environnement À L'homme*, ed. EDP Sciences, pp. 83–114. EDP Sciences
- Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I, Souidi M. 2012. Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1820(7):1121–27
- Welss T, Basketter D a, Schröder KR, Schroder KR. 2004. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro.* 18(3):231–43
- WHO. 2001. Depleted uranium: sources, exposure and health effects. *World Heal. Organ.* 56(3):75–78
- Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, *et al.* 2008. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *Int. J. Radiat. Biol.* 84(5):353–62
- Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, *et al.* 2005. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chem Commun*, pp. 4414–16
- Zhang Z, Michniak-Kohn BB. 2012. Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics.* 4(1):26–41
- Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S. 2009. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch. Toxicol.* 83(1):37–46

Chapitre II – Travaux expérimentaux

PARTIE 1



Evaluation *ex vivo* du potentiel de la nanoémulsion de
1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène
pour la décontamination cutanée d'explants de peaux lésés
superficiellement et contaminés par une solution chargée
en uranium

&

Evaluation *in vitro* de sa toxicité cutanée



Comme cela a été précédemment exposé, la contamination cutanée par des actinides tels que l'uranium est une voie d'exposition préoccupante puisqu'elle représente près de la moitié des accidents de contamination dans l'industrie nucléaire enregistrés en France entre 1970 et 2003. De plus, en cas de contamination par des composés d'uranium, cette exposition entraîne un passage transcutané du radioélément, qui peut être d'autant plus important en cas de lésions de la couche cornée. L'uranium devient alors biodisponible par le biais de la circulation sanguine, et sera en partie stocké dans les reins et le squelette, principaux organes de rétention où sa toxicité pourra ensuite se manifester. C'est dans ce contexte, et en l'absence de traitement spécifique limitant le passage de l'uranium au travers de la peau, qu'une nanoémulsion de type huile dans eau incorporant des molécule de calix[6]arène a été développée au sein de notre laboratoire. Cette nanoémulsion de calixarène paraît être un bon candidat pour le traitement spécifique des contaminations cutanées dues à des composés d'uranium, puisqu'elle permet d'extraire *in vitro* des ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée. De plus, son efficacité après application sur une peau intacte ou sur une peau lésée superficiellement par excoriation (absence de couche cornée) a également été démontrée par des études *ex vivo*.

C'est dans ce contexte que la présente étude a pour objectif :

- d'approfondir le potentiel décontaminant *ex vivo* de la nanoémulsion de calixarène sur des peaux présentant des nouveaux modèles de lésions superficielles contaminées. Son action sera par ailleurs comparée à celle de l'eau savonneuse dans les mêmes conditions expérimentales. En effet, en cas de contamination cutanée par de l'uranium, il est actuellement recommandé de rincer la zone exposée par de l'eau additionnée de savon (Trait rouge®).
- de vérifier l'absence de toxicité cutanée de cette formulation après application, par des études *in vitro* menées sur des épidermes humains reconstitués.

Ainsi, il est démontré que la nanoémulsion de calixarène constitue une bonne alternative pour le traitement de peaux contaminées par de l'uranium, et ce malgré la présence de lésions superficielles telles que des micro-piqûres, micro-coupures ou encore sur une peau excoriée. Cette formulation est d'autant plus prometteuse qu'elle ne présente pas de toxicité cutanée comme le démontre les études *in vitro*, puisque qu'aucune irritation ni effet toxique n'ont été observés, même après une application prolongée de la nanoémulsion jusqu'à 24 h.

Publication 1: *Ex vivo* uranium decontamination efficiency on wounded skin and *in vitro* skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion

Acceptée dans *Journal of Pharmaceutical Sciences*

Sophie Grivès^{1,2,3}, Guillaume Phan³, Guillaume Morat³, David Suhard³, François Rebière³, Elias Fattal^{1,2}

¹ Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

² CNRS, UMR 8612, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

³ Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), PRP-Hom, SDI, Laboratoire de RadioChimie, 31 avenue de la Division Leclerc, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

The present work aims at studying the decontamination efficacy of a calixarene-loaded nanoemulsion on two *ex vivo* wounded skin models mimicking superficial stings or cuts contaminated with uranium, and on a third model using excoriation. The decontaminating formulation was compared to the currently used radio-decontaminating soapy water (Trait rouge®) treatment. Moreover, to assess skin damage potentially induced by the undiluted nanoemulsion, *in vitro* toxicity studies were conducted on an *in vitro* reconstructed human epidermis (RHE), coupled with three different toxicity tests (MTT, LDH and IL-1- α). This work demonstrated not only a significant decontamination activity of the calixarene nanoemulsion on wounded skin, ranging from 92% to 94% of the applied uranium solution according to the *ex vivo* model used, but also the absence of side effects of this promising treatment.

Key words

Calixarene, nanoemulsion, decontamination, uranium, wounded skin

1. Introduction

Cutaneous contamination by radionuclides on intact or wounded skin is a significant source of exposure and accounted for more than half of the recorded accidents in France between 1970 and 2003 ¹. The cutaneous contamination by actinides such as uranium leads to its transcutaneous passage, which is enhanced in the case of wounds, due to the disruption of the protective layer, the *stratum corneum*. This diffusion through the skin can vary depending on the physico-chemical form of the uranium compound, as soluble compounds such as uranyl nitrate or acetate are more readily absorbed than insoluble forms such as oxides ²⁻⁶. The contaminant compounds are then incorporated into the body through the bloodstream and their retention in specific organs leads to potential radiochemical toxicity. Indeed, one part of the systemic load is quickly retained and stored in the target organs, such as the kidneys and the skeleton, whereas the other part is directly excreted in the urine over the first 24 hours after contamination ⁷⁻¹⁰.

Renal uptake of uranium at the proximal tubular cells causes many dysfunctions such as membrane lesions, death of targeted cells, morphological changes in the structure of the glomerulus and functional abnormalities including kidney reabsorption ^{11,12}. Moreover, this nephrotoxicity is particularly important when contamination occurs with soluble and transferable uranium compounds, such as uranyl nitrate, which can cause death due to kidney damage in rats or guinea pigs ^{6,13}. Bone toxicity may also occur after uranium contamination because of the substitution of calcium ions by uranyl ions in the skeleton, leading in particular to a decrease of radial cortical bone growth in young rats ¹⁴. Finally, it has been shown that contamination by uranium can also have deleterious effects on the reproduction of rats and mice ¹⁵⁻¹⁸.

However, no specific and efficient treatment is available in case of such contamination, since only a warm shower with soap and water is generally carried out ¹⁹. In this context, previous studies by our group aimed at developing an emergency treatment for uranium decontamination. As a result, an oil-in-water (O/W) nanoemulsion loaded with calixarene molecules was designed. This nanoemulsion loaded with a specific chelating agent was shown to be highly efficient in avoiding deep skin penetration of uranium on *ex vivo* models in Franz diffusion cells, on intact and excoriated pig ear skins ²⁰.

The goal of the present study was first to confirm the decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion on new superficial skin wound models, reproducing superficial cuts and stings, and mimicking the contaminations due to the mechanical injuries commonly encountered in the nuclear industry ²¹. The nanoemulsion's decontamination efficiency was also tested on a skin excoriation model, and all the data were compared with those obtained with the treatment currently used in nuclear plants: soapy water (e.g. Trait rouge® in France). The second aim of this study was to assess the potential skin toxicity of the calixarene nanoemulsion after different exposure times on an *in vitro* reconstructed human

epidermis, coupled with 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide test (MTT) as well as lactate deshydrogenase (LDH) and interleukin-1- α (IL-1- α) assays.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arene (Figure 1), here called calixarene, was synthesized as described ²². The other compounds used for preparing the calixarene nanoemulsions were paraffin oil ($d = 0.86$, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), non-ionic surfactants sorbitan monooleate (Span[®] 80) and polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween[®] 80), both purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Demineralized water was obtained from a Milli-Q[®] Synergy 185 water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

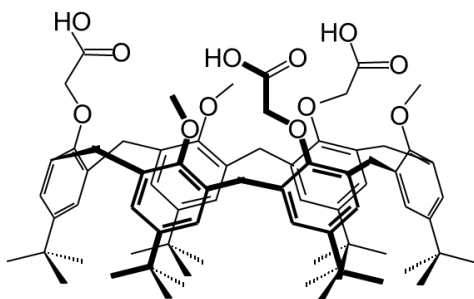


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arene

The uranium-contaminated solution was prepared from depleted uranium solution (1,000 mg.L⁻¹ in 2% HNO₃), purchased from SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon (Longjumeau, France). The isotopic composition was 0.0013% of ²³⁴U, 0.3% of ²³⁵U and 99.6987% of ²³⁸U. The carbonate buffer 0.025 M pH 9.6, used for the receptor medium of Franz diffusion cells, was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The Trait rouge[®] liquid soap used as a control was manufactured by the SORIFA laboratory (Ostwald, France). The following reagents and standards were used for ICP-MS measurements: 67% HNO₃ stock solution (Normatom, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), bismuth (²⁰⁹Bi) stock standard solution at 100 ppb prepared in 2% HNO₃ (from a 10 mg.L⁻¹ single element standard, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France), and a multielemental standard solution containing depleted uranium at 1 pg.L⁻¹ (from a 10 mg.L⁻¹ tuning solution, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) prepared in 2% HNO₃. For skin contamination, the uranium solution in acetate buffer was prepared to a final concentration of uranium at 10 mg.L⁻¹ pH 5.

2.2. Preparation and characterization of calixarene-loaded nanoemulsion

The emulsion inversion point method was used to prepare the O/W calixarene nanoemulsion as previously described ²³. To sum up, water was added drop by drop into a mixture of paraffin oil (20%) and surfactants

(5%) under stirring at 50°C. Calixarene was added to the oily phase at a concentration of 4 mg.g⁻¹. The dispersed oil droplet size and zeta potential were both measured with a Nanosizer/Zetasizer® ZS apparatus (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) and pH measurements were carried out with a MeterLab/pH M240 pH-meter (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

2.3. *Ex vivo* uranium decontamination efficiency

The diffusion kinetics of uranium through the skin was evaluated using a Franz diffusion cells system (MicroettePlus™ apparatus, Hanson Research Corp., Chatsworth, California, USA) for 24 h. To carry out the experiments, full thickness skin pieces were removed from pig ears that were purchased from a slaughterhouse (Guy Harang abattoir, Houdan, France), with the authorization of the French Departmental Directorate of Veterinary Services of the Hauts-de-Seine, and stored at -20°C until use. Each sample was depilated and superficially wounded as described below.

As previously defined ²⁴, skin samples were inserted between the receptor and the donor compartments of the diffusion cells, with the dermal face in contact with the 0.025 M carbonate buffer receptor medium, and the whole system was fixed with a clamp. The receptor medium was kept under stirring at constant temperature (38 ± 0.1°C) during the experiments, which were conducted under occlusive conditions. Contamination with 600 µL of the 10 mg.L⁻¹ uranyl nitrate solution at pH 5 was performed on intact or wounded pig ear skin. 600 µL of the calixarene nanoemulsion treatment was then immediately added, and the diffusion kinetics of uranium through the skin was evaluated for 24 h by sampling and dosage of the receptor medium at 0, 5, 15, 30 min and 2, 4, 12, 18 and 24 h. At the end of the experiment, the content of the donor compartment in each cell was aspirated to quantify the uranium. The diffusion of uranium was compared to the diffusion obtained after immediate application of a non-loaded nanoemulsion, acetate buffer and soapy water under the same conditions. All skin explants were sampled and frozen until the analysis for uranium content by ICP-MS. In order to measure the uranium content on these explants, the digestion of skin pieces was carried out with 67% HNO₃ stock solution and 30% H₂O₂ (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), using the ETHOS One® microwave oven (Milestone Srl, Sorisole, Italy).

2.4. Simulations of superficial wounds

Three superficial wound models were simulated: i) by microneedles of 0.7 mm of length (Dermaroller®, Wolfenbüttel, Germany), to mimic a superficial sting; ii) by incision induced by Surgicutt® system (Surgicutt® Junior, CML, Nemours, France), to mimic a superficial cut by a 1 mm blade; and iii) by excoriation to remove the *stratum corneum*, to mimic a superficial scratch. In order not to interfere with the application of products and the diffusion of uranium, all skins samples were previously depilated using a depilating cream (Veet® sensitive skin). The characteristics of the three types of models are summed up in table 1. Samples were fixed with a solution containing 2.5% glutaraldehyde for 1 h at room temperature, then dehydrated in

an ethanol bath, and permeabilized with a propylene oxide/Epon mixture. Finally, samples were embedded in pure Epon-type resin. Several thin sections (1 μm) embedded in resin were cut.

Table 1: Summary of the different superficial wounds models applied on the pig ear skin for the study of the decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion.

Type	Wounds	Means	Simulated wounds
Incision	Supercifial sting	Microneedles	Supercifial sting
Incision	Cut	Surgicutt®	Supercifial cut
Excision	Excoriation	Tape stripping	Superficial scratch

2.5. Thickness and Transepidermal Water Loss of skin pieces

After wounding, the thickness of the skin pieces was measured using a thickness gage (Mitutoyo Corporation, Roissy, France). The mean thickness of intact or wounded skin was 1.11 ± 0.1 mm. Transepidermal Water Loss (TEWL) was measured using a Tewameter TM 300® (Monaderm®, Monaco) equipped with an adapted probe. According to the apparatus specifications, TEWL values below $15\text{--}25 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ can reflect the skin barrier integrity; whereas TEWL values exceeding $30 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ can indicate a disruption of the skin barrier.

2.6. Sample analysis

After a hundred-fold dilution in 2% nitric acid solution of each sample taken from the Franz cells diffusion, ^{238}U was directly measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Agilent 7700x) using the optimized protocols originally designed for human urine samples^{25–27}. In each sample or calibration solution, 100 μL of ^{209}Bi was added as an internal standard, at 100 ppb. Skin samples were previously mineralized by microwaves as described above and then analyzed for uranium content as the other samples by ICP-MS measurement after a two-hundredth dilution in 2% nitric acid solution. The cumulative amounts of uranium permeating through the skin were expressed as a percentage of the amount of uranium deposited on each skin biopsy, and plotted against time. The amount of uranium recovered at the end of the 24 h experiment in skin explants and the one remaining in the donor compartments were also expressed as a percentage of the amount of uranium initially deposited. Lag time values were calculated by extrapolation to the time axis of the linear parts of the curves representing the amount of uranium diffused through the skin over time. The slope of the linear part of the curves yielded the pseudo steady-state flux J_{ss} ($\text{ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$), and the permeability coefficients K_p (cm.h^{-1}) were calculated as $K_p = J_{ss}/C$, with C corresponding to the concentration in the donor compartment.

2.7. Assessment of *in vitro* skin toxicity of calixarene-loaded nanoemulsion

2.7.1. Tissues, culture conditions and treatments of skin units

The skin toxicity potentially induced by the calixarene nanoemulsion was measured using a three-dimensional reconstructed human epidermis (RHE) model (SkinEthic Laboratories, Lyon, France). For this purpose, 16 μL of each test substance were applied on tissues for different exposure times and different times of post-incubation treatment. In accordance with OECD Test Guideline No. 439²⁸, the skin irritation Test^{42bis} was performed. This test was designed for the prediction of acute skin irritation of chemicals by measurements of its cytotoxic effect, as reflected in the methyl tetrazolium (MTT) assay²⁹, purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, USA). First of all, each product tested was left in contact with the tissues for 42 min under sterile conditions. Then the tissues were rinsed with 25 mL of Dulbecco's sterile phosphate buffer saline (PBS), mechanically dried, and a post-incubation was carried out on 2 mL growth culture medium for 42 h at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidified atmosphere (all culture medium used were purchased from SkinEthic Laboratories, Lyon, France). The second assay consisted in increasing the contact time, and leaving the different treatments for 2 h, with a post-incubation of 42 h. Then, the last test consisted in a 24 h exposure without post-incubation. PBS was used as negative control and a 20% sodium dodecyl sulphate (SDS) solution, purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), was used as a positive control after a four-fold dilution in water. Non-loaded nanoemulsion was also used as a control treatment. Each test was performed on three tissue replicates. At the end of each post-incubation, a MTT test was carried out directly on each tissue, and the culture medium was sampled to measure the release of IL-1- α by a quantitative sandwich immunoassay technique using the Human IL-1 alpha ELISA kit. The lactate dehydrogenase (LDH) release was measured by using a lactate dehydrogenase assay kit. Both kits were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA).

2.7.2. Irritation measurement by MTT test

The tissue viability was first assessed by MTT reduction. The blue formazan crystals formed, qualitatively proportional to the cell viability, were extracted using 1.5 mL isopropanol for 2 h at room temperature and three replicates per tissue were sampled to be quantified by spectrophotometry at a wavelength of 570 nm. For each treated tissue, the cell viability was expressed as the percentage of the mean negative control tissues. For the Test^{-42bis}, values under or equal to 50% are used to classify the test substance as an irritant²⁹.

2.7.3. Measurement of IL-1- α release

The levels of extracellular IL-1- α released in the supernatants by the RHE were determined by an *in vitro* quantitative sandwich immunoassay technique with a detection limit of 0.5 pg.mL⁻¹. 100 μ L of each standard and non-diluted sample were added in duplicate into the appropriate pre-coated wells and incubated for 2.5 h at room temperature with gentle shaking, allowing the molecules of IL-1- α present in the samples to bind to the wells by the immobilized antibody. Then the wells were washed 4 times with 300 μ L of wash solution 1x included in the kit, and 100 μ L of biotinylated detection antibody were added in each well, which were incubated for 1 h at room temperature with gentle shaking. The incubation solution was removed and the washing step was repeated. 100 μ L of prepared HRP-Streptavidin solution were then added to each well, followed by incubation for 45 min at room temperature with gentle shaking. After removing the solution and repeating the washing steps once, 100 μ L of colorimetric TMB reagent were added to each well. Incubation for 30 min at room temperature in the dark with gentle shaking was performed. 50 μ L of stop solution were then added in each well and the microplate was read immediately at 450 nm.

After calculating the mean absorbance obtained for each duplicate of samples and standards, and subtracting the average zero standard optical density, the concentration of IL-1- α in each sample was calculated on the basis of the standard curve.

2.7.4. Measurement of LDH release

LDH is an oxidoreductase enzyme that catalyzes the interconversion of pyruvate to lactate, and its release is used as a marker of tissue damage by measuring its activity. The LDH assay measures the reduction of NAD to NADH by the LDH present in the different samples through colorimetric detection (450 nm). After preparing samples and NADH standard preparations in the LDH Assay Buffer provided in the kit, 50 μ L of these samples and standards were brought into contact with 50 μ L of the Master Mix Reaction (included in the kit) in a 96-well plate, protected from light. After 3 min of gentle shaking, the initial absorbance at 450 nm [(A450)_{initial}] was measured. The plate was then incubated at 37°C in the dark, after the final

measurement $[(A450)_{\text{final}}]$ for calculating the enzyme activity. The incubation time was previously defined so that the final measurement is within the linear range of the standard curve. All samples and standards were run in duplicate.

After subtracting the final measurement $[(A450)_{\text{final}}]$ obtained for the blank of the other readings, the standard curve set up for each incubation time was plotted. The change from the initial measurement to the final measurement $[(A450)_{\text{initial}}] - [(A450)_{\text{final}}]$ for the samples was compared to the standard curve to determine the amount of NADH generated by the kinase assay. The LDH activity of each sample was then calculated by the following equation, with B corresponding to the amount of NADH generated over the contact time (nmole), and V the sample volume (mL) added to the well:

$$\text{LDH activity} = \frac{B \times \text{Sample dilution factor}}{V \times \text{Reaction time (min)}}$$

2.8. Statistical analysis

In all the experiments, data were expressed as mean \pm standard deviation and were analyzed by Student *t* test. Differences were considered to be significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Superficial wounds

The different wound models applied on pig ear skin were previously validated by microscopic observation of skin sections, with several transverse skin cuts and skin top views, as shown in figure 2. These histological images show that the excoriation thoroughly removes the *stratum corneum*. The sharp cuts induced by the Surgicutt® with their impacts on the skin and the remaining presence of the *stratum corneum* are visible. It is also possible to observe the microlesions caused by the microneedles. The number of tape strips required to remove the *stratum corneum* was determined after a histological study, and showed that 30 tape strips using a D-Squame® 150 g.cm⁻² applicator (Monaderm, Monaco, France) were necessary to allow removal of the whole *stratum corneum*. After wounding the skin with 50 superficial cuts, or 12 applications of the microneedle arrays containing 16 microneedles, the main TEWL values measured according to the skin condition (different superficial wounds) expressed in g.m⁻².h⁻¹ were 54 ± 6 for Surgicutt® wounds and 48 ± 5 for microneedle wounds. The main TEWL values were 57 ± 4 after excoriation and 11 ± 3 for intact skin. These TEWL values indicate a disruption of the skin barrier whatever the superficial wounds caused on the skin.

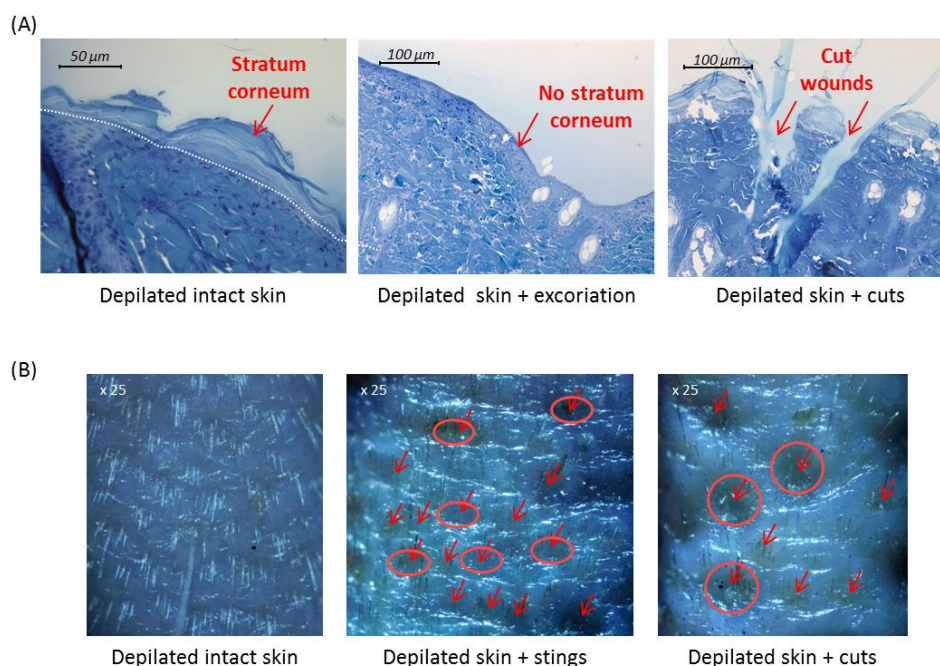


Figure 2: Histological views of skin sections performed with an optical microscope: (A) transverse skin cuts, (B) skin top views, wounds impacts are pointed by arrows.

3.2. *Ex vivo* decontamination efficiency

The kinetics of the percutaneous diffusion of uranium through pig ear skin was followed for 24 h using the Franz diffusion cells system. In this study, the three different wound models described above were used to assess the efficiency of our calixarene nanoemulsion, in comparison with the non-loaded nanoemulsion, on the one hand, and with soapy water treatments, currently used in case of cutaneous contamination, or with a simple dilution with acetate buffer, on the other hand. As shown in [figure 3](#), the kinetics profiles were similar for the three types of wounds generated on the skin. Uranium started to appear in the receptor medium at the earliest between 5 and 6 hours after contamination whatever the treatment or the nature of the wound. Diffusion across excoriated skin was higher ([Figure 3A](#)) compared to skin wounded with Surgicutt® ([Figure 3B](#)) or microneedles ([Figure 3C](#)). In all cases, the diffusion was significantly prevented when using calixarene nanoemulsion compared to the non-loaded nanoemulsion or acetate buffer and soapy water ([Figure 3](#)). On the excoriated skin, the diffusion of uranium was higher with acetate buffer and soapy water. On the wounds caused by Surgicutt® or microneedles, the diffusion was higher when the skin was treated with the non-loaded nanoemulsion compared to the other treatments ([Figure 3B & C](#)).

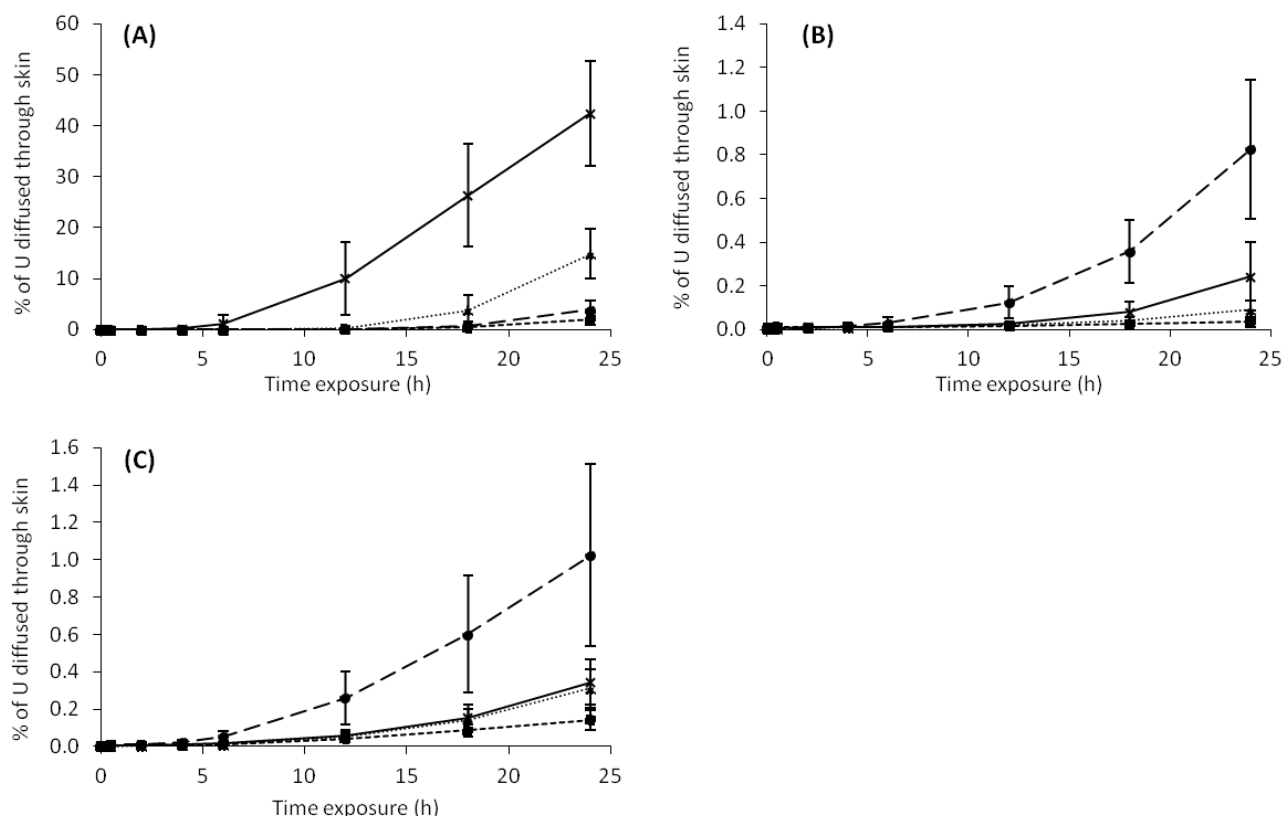


Figure 3: Uranium percutaneous diffusion kinetics on Franz diffusion cells during 24 h through: (A) excoriated skin (tape stripping); (B) skin wounded by cuts (Surgicutt®); (C) skin wounded by stings (microneedles), and treated by: (X) soapy water; (▲) acetate buffer; (●) non-loaded nanoemulsion; (■) calixarene nanoemulsion. The treatment was immediately applied after the contamination step. Each point corresponds to the mean of the assays \pm standard deviation ($n = 8$ to 11).

On the excoriated skin, the absence of migration of uranium through skin layers was observed particularly with the calixarene nanoemulsion since $84.96 \pm 1.89\%$ remained in the donor phase (Figure 4A) whereas this number was $64.96 \pm 15.25\%$ for the non-loaded nanoemulsion, $39.49 \pm 10.81\%$ for the acetate buffer and $40.97 \pm 4.48\%$ for soapy water. In the case of the absence of *stratum corneum*, a small amount of uranium was retained in the skin explant after a treatment with soapy water and calixarene nanoemulsion, with respectively $16.59 \pm 7.78\%$ and $13.02 \pm 2.25\%$, in comparison to the treatment with acetate buffer ($45.66 \pm 13.63\%$) and the application of non-loaded nanoemulsion ($31.14 \pm 15.30\%$) (Figure 4A).

On wounds caused by superficial incisions (Surgicutt®), the same trend as on the excoriated skin was observed regarding the amount of uranium remaining in the donor compartment (Figure 4B), the percentage of uranium not diffusing being $93.32 \pm 2.17\%$ after the calixarene nanoemulsion treatment, $77.47 \pm 11.21\%$ after the application of the non-loaded nanoemulsion, and respectively $61.65 \pm 9.10\%$ and $63.93 \pm 7.17\%$ after the acetate buffer and soapy water control treatments. However, very little uranium was retained in the skin in the case of calixarene nanoemulsion ($6.65 \pm 2.18\%$) despite the presence of the *stratum corneum*, compared to the other groups: $21.70 \pm 11.51\%$ for non-loaded nanoemulsion, $38.26 \pm 9.11\%$ for acetate buffer and $35.82 \pm 7.20\%$ for soapy water.

On wounds caused by microneedles, the calixarene formulation treatment still prevented the diffusion of uranium with $94.47 \pm 1.91\%$ of non-diffused uranium and only $5.38 \pm 1.91\%$ of uranium retained in the skin. However, the distribution of the quantity of non-diffused uranium and uranium found in the skin was slightly different than previously observed (Figure 4C). This time, after application of the acetate buffer, less uranium was trapped in the skin ($13.99 \pm 4.30\%$) and more was still in the donor compartment ($85.69 \pm 4.26\%$) at the end of the experiment. For the treatment with soapy water, we observed respectively $65.40 \pm 8.41\%$ and $34.25 \pm 8.48\%$ of non-diffused uranium and uranium in the skin, and in the same order $72.03 \pm 9.12\%$ and $26.94 \pm 9.20\%$ for the treatment with non-loaded nanoemulsion.

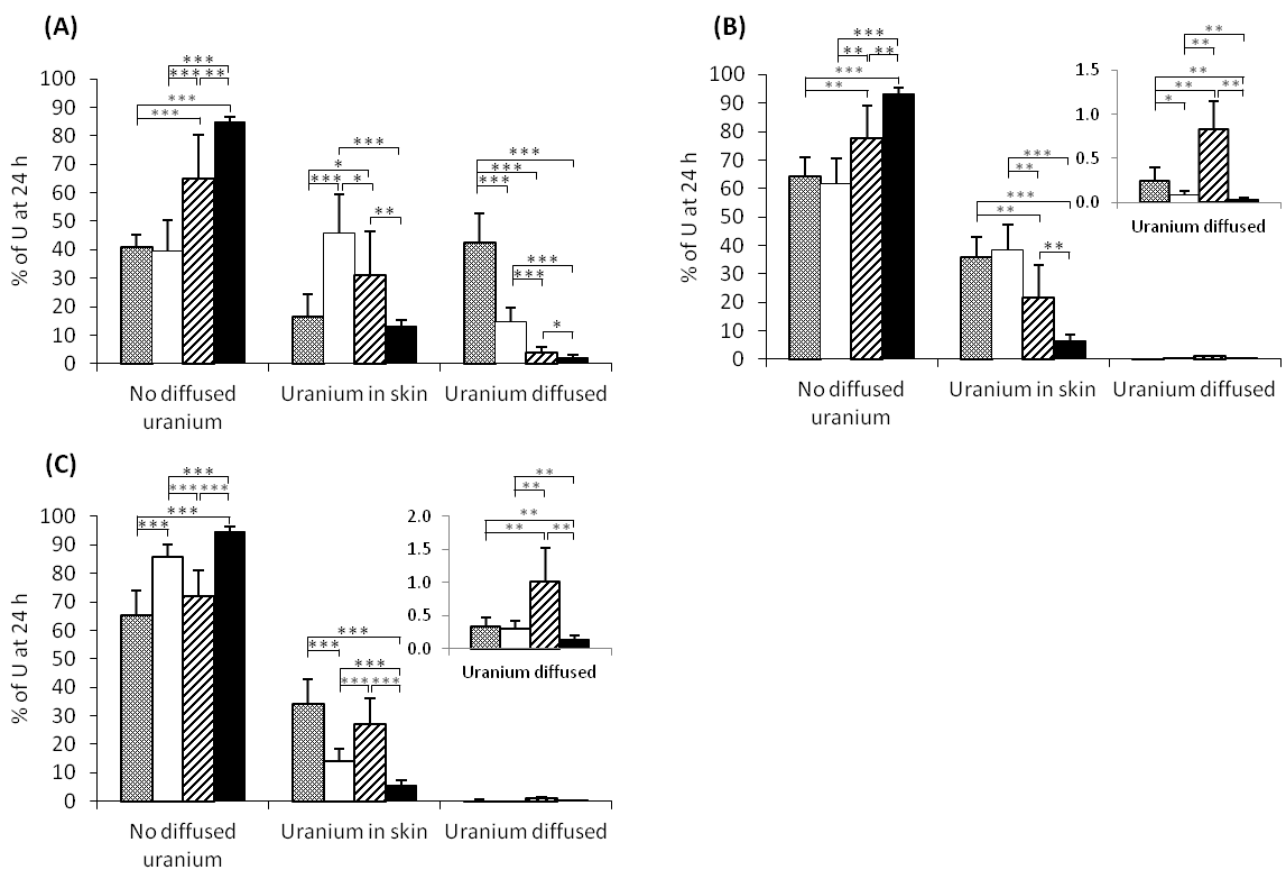


Figure 4: Distribution in the different compartments of the quantity of uranium at the end of the 24 h of percutaneous diffusion kinetics on Franz diffusion cells: uranium i) not diffused in donor compartment; ii) retained by the skin; iii) and diffused in receptor compartment (already presented in figure 3). Various treatments were applied: \square soapy water; \square acetate buffer; \square unloaded nanoemulsion; \blacksquare calixarene nanoemulsion ; on different skin models: (A) studies on excoriated skin (tape stripping); (B) using skin wounded by cuts (Surgicutt[®]); and (C) results obtained on skin wounded by sting (microneedles). Results are presented as the mean of 8 to 11 values \pm standard deviation; * = significantly different with $p < 0.05$ (Student t test); ** = significantly different with $p < 0.01$ (Student t test); * = significantly different with $p < 0.001$ (Student t test).**

Whatever the wounds induced on skin, the permeability coefficient (K_p) and the pseudo steady-state flux (J_{ss}) calculated (Table 2) were lower after a treatment with the calixarene-nanoemulsion compared to the other treatments. These kinetics data confirmed the efficiency of the calixarene nanoemulsion, allowing a decrease of the transcutaneous passage of uranium. Moreover, in case of excoriated skin, although the theoretical lag times were overestimated, they were higher after a nanoemulsion treatment than after

application of soapy water or acetate buffer, allowing a delay of the percutaneous diffusion of uranium. These values were relevant with K_p and J_{ss} values. In contrast, the theoretical lag times in case of skin wounded with Surgicutt® or microneedles were not representative because of the low slopes of the diffusion curves.

Table 2: Kinetics data based on the diffusion of uranium through superficial wounded skins after prompt application of different treatments (mean \pm SD of $n = 8$ to 11)

	Lag time (h)	Flux, J_{ss} (ng.cm ⁻² .h ⁻¹)	Permeability coefficient, K_p (cm.h ⁻¹)
Excoriation			
Soaped water	8.3 \pm 2.9	1.7 $\times 10^{-1} \pm 3.5 \times 10^{-2}$	1.7 $\times 10^{-5} \pm 3.5 \times 10^{-6}$
Acetate buffer	13.7 \pm 2.8	8.9 $\times 10^{-2} \pm 2.6 \times 10^{-2}$	8.9 $\times 10^{-6} \pm 2.6 \times 10^{-6}$
Unloaded nanoemulsion	13.1 \pm 0.8	2.5 $\times 10^{-2} \pm 1.1 \times 10^{-2}$	2.5 $\times 10^{-6} \pm 1.1 \times 10^{-6}$
Calixarene nanoemulsion	13.3 \pm 0.4	1.4 $\times 10^{-2} \pm 8.0 \times 10^{-3}$	1.4 $\times 10^{-6} \pm 8.0 \times 10^{-7}$
Cut			
Soapy water	10.1 \pm 3.7	1.2 $\times 10^{-3} \pm 8.3 \times 10^{-4}$	1.2 $\times 10^{-7} \pm 8.3 \times 10^{-8}$
Acetate buffer	10.8 \pm 8.1	3.3 $\times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$	3.3 $\times 10^{-8} \pm 1.1 \times 10^{-8}$
Unloaded nanoemulsion	10.4 \pm 1.4	3.8 $\times 10^{-3} \pm 1.1 \times 10^{-3}$	3.8 $\times 10^{-7} \pm 1.1 \times 10^{-7}$
Calixarene nanoemulsion	5.4 \pm 4.3	1.1 $\times 10^{-4} \pm 6.5 \times 10^{-5}$	1.1 $\times 10^{-8} \pm 6.5 \times 10^{-9}$
Sting			
Soapy water	10.3 \pm 0.9	1.7 $\times 10^{-3} \pm 6.9 \times 10^{-4}$	1.7 $\times 10^{-7} \pm 6.9 \times 10^{-8}$
Acetate buffer	10.3 \pm 1.5	1.6 $\times 10^{-3} \pm 5.0 \times 10^{-4}$	1.6 $\times 10^{-7} \pm 5.0 \times 10^{-8}$
Non-loaded nanoemulsion	7.6 \pm 2.4	4.1 $\times 10^{-3} \pm 1.8 \times 10^{-3}$	4.1 $\times 10^{-7} \pm 1.8 \times 10^{-7}$
Calixarene nanoemulsion	6.8 \pm 2.3	6.4 $\times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-4}$	6.4 $\times 10^{-8} \pm 2.5 \times 10^{-8}$

3.3. *In vitro* toxicity of calixarene-loaded nanoemulsion

To obtain a clear observation of the potential irritation induced by our formulation, we used RHE models in which we applied different tests assuming that the formulation or its components are able to penetrate the *stratum corneum* and are cytotoxic to the cells in the underlying layers³⁰. The toxicity end points that were determined were the cell viability by MTT, as well as the release of the cytokine IL-1- α as a potential pro-inflammatory cytokine³¹ and of the LDH release, which reflect membrane damages.

3.4. MTT

The studies were conducted under three different conditions, varying the exposure time between 42 min, 2 h and 24 h, with or without post-incubation (Figure 5). Under these three conditions, the mean tissue viability expressed by the mitochondrial activity evaluated by the MTT after SDS 5% solution exposure (positive control) was between $0.44 \pm 0.002\%$ and $1.44 \pm 0.001\%$. By contrast, whatever the considered conditions, the mitochondrial activity was between $97.43 \pm 0.024\%$ and $107.41 \pm 0.092\%$ after exposure to the non-loaded nanoemulsion or to the calixarene nanoemulsion, compared to the positive control.

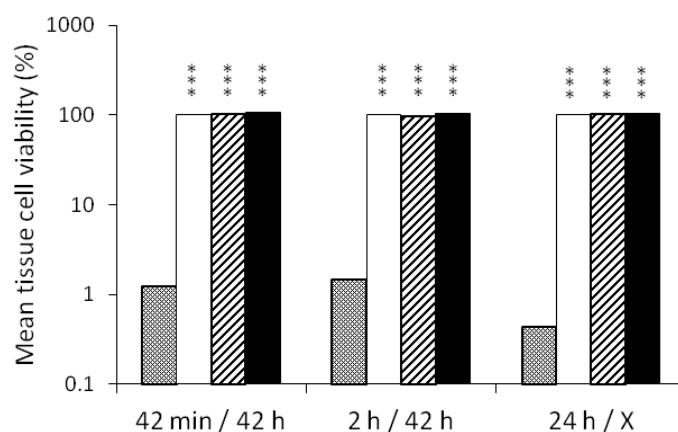


Figure 5: Percent tissue cell viability after application of test chemicals depending on topical exposure time and time of post treatment incubation: 42 min / 42 h = 42 min of topical application and 42 h of post-treatment incubation; 2 h / 42 h = 2 h of topical application and 42 h of post-treatment incubation; 24 h / X = 24 h of topical application and no post-treatment incubation; ▨ positive control: 5% SDS solution; □ negative control: PBS; ▨ non-loaded nanoemulsion; ■ calixarene nanoemulsion. Results are presented as the mean of 9 values \pm standard deviation; * = significantly different from the positive control 5% SDS solution for a same condition of exposure time and post-incubation with $p < 0.001$ (Student *t* test).**

3.5. IL-1- α

The cytotoxicity induced after the different exposure times of treatment on the RHE tissues was also evaluated on the basis of the cell release of the pro-inflammatory mediator IL-1- α (Figure 6A). The concentrations of IL-1- α recovered on supernatants after exposure of the tissues to the SDS 5% solution were respectively 69.72 ± 0.13 pg.mL⁻¹, 103.58 ± 0.15 pg.mL⁻¹ and 162.25 ± 0.04 pg.mL⁻¹ after an exposure of 42 min and 2 h (both with 42 h of post-incubation treatment), and after 24 h of exposure without post-incubation. For all the other treatments, the release of IL-1- α decreased when the contact time increased, and was in any case very low, with a maximum concentration of IL-1- α of 9.57 ± 0.03 pg. mL⁻¹. In some cases, this concentration was too low to be detected, meaning the concentration was below 0.5 pg.mL⁻¹, which corresponds to the limit of detection.

3.6. LDH activity

The cytotoxicity induced after the different exposure times of treatment on the RHE tissues was then evaluated on the basis of the cell release of LDH, reflecting the cell membrane integrity. The LDH activity is expressed as milliunit.mL⁻¹ (Figure 6B), defined as the amount of enzyme that catalyzes the conversion of lactate into pyruvate to generate 1.0 mole of NADH per minute at 37°C. The LDH activity measured after exposure of the tissues to the SDS 5% solution were respectively 5.00 ± 0.38 , 16.65 ± 2.49 and 18.59 ± 6.87 milliunit.mL⁻¹ (respectively for 42 min and 2 h, both with 42 h of post-incubation treatment, and after 24 h of exposure without post-incubation), compared to 0.36 ± 0.12 and 1.67 ± 0.35 milliunit.mL⁻¹ for all the other treatments and all conditions combined.

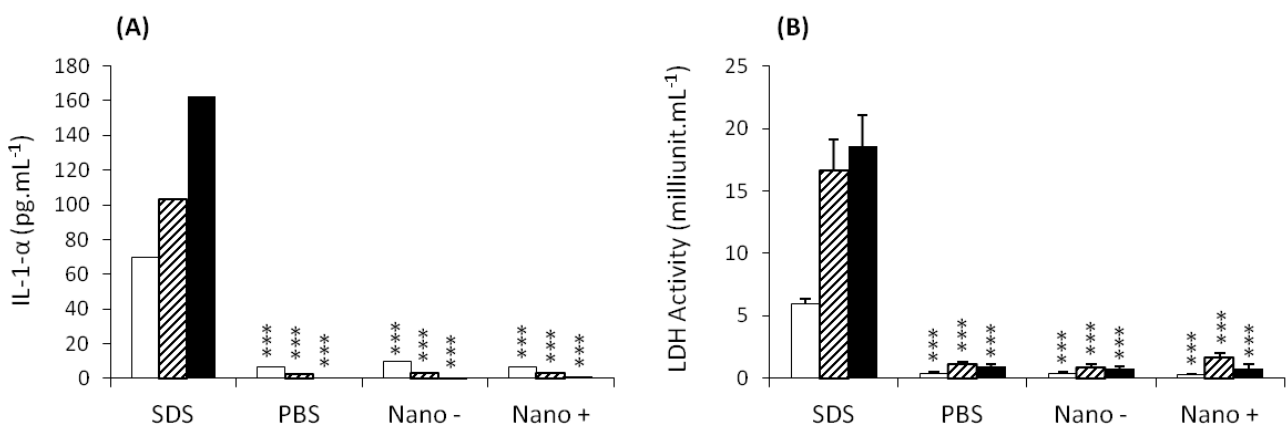


Figure 6: Toxicity of treatments on RHE tissues by measuring (A) the release of the cytokine IL-1- α in the supernatants, and (B) the release of the cellular enzyme LDH in the supernatants, both reflecting the membrane damages. These releases were correlated to the exposure time between i) tissues and treatment: SDS = 5% SDS solution; PBS = Phosphate Buffer Saline; Nano - = unloaded nanoemulsion; Nano + = calixarene nanoemulsion, ii) and the time of post-exposure: □ 42 min of exposure followed by 42 h of post-incubation treatment; ▨ 2 h of exposure followed by 42 h of post-incubation treatment; ■ 24 h of exposure without post-incubation. Results are presented as the mean of 9 values \pm standard deviation; * = significantly different from the positive control 5% SDS solution for a same condition of exposure time and post-incubation with $p < 0.001$ (Student t test).**

4. Discussion

Prior to this study, we designed a calixarene nanoemulsion and demonstrated its ability to remove uranium from skin after artificial contamination^{20,23,24}. In this study, we aimed to demonstrate the potentiality of this formulation for preventing the diffusion of uranium through the skin on *ex vivo* models after generating different types of superficial wounds. These *ex vivo* efficiency studies were carried out on pig ear skin set up on Franz diffusion cells because it is known to be the most representative model of human percutaneous absorption^{32–36}. The external face of pig ear skin explants were put in contact with carbonate-bicarbonate buffer as receptor fluid. This solution ensures sink conditions and high uranium solubility. Moreover, the use of 0.025 M carbonate-bicarbonate buffer allowed us to reproduce the blood medium in which uranium is strongly bound to carbonate ions once it has passed through the skin and penetrated into the bloodstream³⁷.

Uranium diffusion through intact skin was previously studied and shown to be both slow and low, correlating with *in vivo* experiments carried out on intact rats back skin^{4,5} where uranium was not detected in the blood for 24 h although it was found in the kidneys after 6 h and in urine after 24 h. In addition, this passage could be dramatically increased in case of contamination through wounds. Our aim was to evaluate both uranium transport across wounded skin and the decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion so that the formulation can be applied on wounded skin in the nuclear industry. For this purpose, we developed superficial wound models consisting in incisions by Surgicutt® and stings by microneedles to generate new contaminated superficial wound models mimicking the stings and cuts frequently encountered in practice¹. Such systems have often been used for bleeding time determination³⁸, or to simulate compromised skin³⁹ or, in the case of microneedles, to promote the delivery of pharmaceuticals^{39–41}. The results presented above show that the developed contaminated superficial wound models caused damages to the first skin layers, as shown by the histological images of skin sections and the measurement of the TEWL values which were above the critical value of 30 g.m⁻².h⁻¹.

In the uranium diffusion studies on Franz cells, the presence of the *stratum corneum* on the skin wounded by incisions and microneedles explains the lower passage of uranium, whatever the treatment applied. Indeed, it was already known that the *stratum corneum* is a good barrier against percutaneous absorption, and that this is where uranium gets trapped²⁰. This skin layer behaves therefore as a reservoir delaying the systemic uranium intake⁶. On these models, the non-loaded nanoemulsion was unexpectedly shown to increase the transport of the radionuclide through the skin when wounds were caused by microneedles or Surgicutt®. However, this phenomenon seems to be negligible because it involves very small quantities of uranium in comparison to the ones diffusing through an excoriated skin. Nevertheless, it could be explained by the potential presence of micelles formed with free surfactant in the non-loaded nanoemulsion. These

micelles could promote the passage of uranium through the skin and particularly on skin still containing *stratum corneum*. Conversely, soapy water increased the transcutaneous diffusion of uranium only in the absence of *stratum corneum* in the excoriated skin model, probably because the diffusion barrier and the reservoir effect of the *stratum corneum* to uranium are disrupted.

These *ex vivo* studies show the interest of the calixarene nanoemulsion as an emergency decontamination treatment for superficially wounded skin, in comparison to the other treatments currently used. Indeed, in all cases presented here, the calixarene nanoemulsion allows a large decrease of the transcutaneous diffusion of uranium; 59 to 95% compared to the soapy water treatment, and 55 to 89% compared to a simple dilution effect achieved with acetate buffer. Moreover, the specific chelation effect of the calixarene in the nanoemulsion was clearly demonstrated in these studies, in comparison to the non-loaded nanoemulsion.

Studies were conducted to investigate the effects of calixarene nanoemulsion on skin in order to ascertain the acceptability of this formulation as a cutaneous treatment. For this purpose, reconstructed human epidermis models (RHE®) were used. Toxicity results showed an obvious innocuousness of the nanoemulsion as carrier and of the calixarene loaded nanoemulsion. Cell viability was evaluated by the MTT assay to predict the irritancy potential by the calculation of the mean tissue viability of tissue exposed to negative and positive controls as well as to the other products. SDS 5% solution was used as a positive control because it is known to affect tissue integrity⁴². The acceptance criterion of a positive control is if the data of the mean viability, expressed as % of the negative control values, is under 40%. Accordingly, the test substance is considered to be a skin irritant (category 2) if the mean viability after the exposure time and the post-incubation is less or equal to 50% of the negative control²⁹. Moreover, pro-inflammatory cytokines, such as IL-1- α , are involved in the initiation of the inflammatory process. In the absence of exogenous stimuli, IL-1- α concentrations are low in cells, and they are re-synthesized when cells are activated⁴³. This is why the quantification of IL-1- α release was followed as an earlier marker of tissue inflammation and toxicity. Finally, cell membrane damage was also evaluated by quantification of LDH release.

Whatever biochemical parameters of cytotoxicity followed in these studies (MTT activity, IL-1- α and LDH release), the results revealed that the nanoemulsions used undiluted could be considered to be non-irritant to skin, inducing no cutaneous damages or inflammatory effect. As regard a topical application, they were as safe as the negative control (PBS). Moreover, the toxicity results on RHE® show that the calixarene nanoemulsion was safe after 42 min and 2 h of exposure time, both followed by 42 h of post-incubation after rinsing. Moreover, no damage was induced by the nanoemulsions even after 24 h of exposure time, corresponding to the contact time used during *ex vivo* experiments.

5. Conclusion

Cutaneous uranium contamination is currently a major problem in nuclear workplaces, due to the lack of specific and efficient emergency treatment. *Ex vivo* results obtained in the present study using Franz diffusion cells demonstrate that the nanoemulsion loaded with specific uranium chelating agents such as calixarene can be a good alternative for treating contaminated intact or superficially wounded skin. Moreover, this calixarene nanoemulsion is particularly promising since it did not induce skin irritation as demonstrated by *in vitro* results from experiments carried out on reconstructed human epidermis. The main perspective of this study consisted in studying the cutaneous decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion *in vivo*.

6. Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. H. Hillaireau (CNRS UMR 8612, Institut Galien Paris-Sud) and Dr. J.M Bertho (IRSN, Laboratoire de RadioToxicologie) for useful scientific discussions. Research funds were granted by the Direction Générale pour l'Armement (DGA) and the Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).

References

1. Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, *et al.* Exposure to actinides : report on Ca-DTPA injections in CEA-AREVA centres. *Radioprotection*. 2007;42:163-196.
2. Griffiths NM, Wilk JC, Abram MC, *et al.* Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys*. 2012;103(2):187-94.
3. Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82(2):133-139.
4. Petitot F, Frelon S, Moreels AM, *et al.* Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Heal Phys*. 2007;92(5):464-474.
5. Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat Prot Dosim*. 2007;127(1-4):125-130.
6. De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environ Res*. 1983;30(2):480-491.
7. Hengé-Napoli MH, Ansoborlo E, Houpert P, *et al.* Progress and Trends in In Vivo Chelation of Uranium. *Radiat Prot Dosimetry*. 1998;79(1):449-452.
8. Leggett RW, Pellmar TC. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact*. 2003;64(2-3):205-225.
9. Bleise A, Danesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact*. 2003;64(2-3):93-112.
10. Souidi M, Tissandie E, Racine R, *et al.* Uranium: Properties and biological effects after internal contamination. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009;67(1):23-38.
11. Diamond G. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol*. 1989;13(1):65-78.
12. Ozmen M, Yurekli M. Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1998;6(2):111-115.
13. Kathren RL, Burklin RK. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys*. 2008;94(2):170-179.
14. Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I, Souidi M. Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):1121-7.
15. Arfsten DP, Schaeffer DJ, Johnson EW, Robert Cunningham J, Still KR, Wilfong ER. Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ Res*. 2006;100(2):205-15.
16. Domingo JL. Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol*. 2001;15(6):603-609.

17. Ortega, A., Domingo, J. L., Gómez, M., & Corbella, J. (1989). Treatment of experimental acute uranium poisoning by chelating agents. *Pharmacology & Toxicology*, 64(3), 247–51.
18. Sánchez DJ, Bellés M, Albina ML, Gómez M, Linares V, Domingo JL. Exposure of pregnant rats to uranium and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Toxicology*. 2006;228(2-3):323-32.
19. French Nuclear Safety Authority (ASN). National Guide: Medical intervention in case of nuclear or radiological event. 2008.
20. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, et al. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79(2):258-267.
21. Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW, F. Eckerman K, W. Townsend L. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosim*. 2003;105(1-4):509-512.
22. Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B. Para-tertio-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations, French Patent. 2006;(FR-2006/001105).
23. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *J Pharm Sci*. 2010;99(3):1375-1383.
24. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. A new formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination. *Health Phys*. 2010;99(3):430-434.
25. Baglan N, Cossonnet C, Trompier F, Ritt J, Bérard P. Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys*. 1999;77(4):455-461.
26. Bouvier-Capely C, Baglan N, Montegue A, Ritt J, Cossonnet C. Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. *Heal Phys*. 2003;85(2):216-219.
27. Bouvier-Capely C, Ritt J, Baglan N, Cossonnet C. Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Appl Radiat Isot*. 2004;60(5):629-633.
28. Guidelines O 439. OECD Test Guideline No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. 2013;(July):1-21.
29. EpiSkin™ SOP. *Invitox Protocol Skinethic™ Skin Irritation Test -42bis.*; 2012.
30. Eskes C. Application of alternative methods in the regulatory assessment of chemical safety related to human skin corrosion and irritation. *Orange House Patnersh*. 2010.
31. Tornier C, Rosdy M, Maibach HI. In vitro skin irritation testing on reconstituted human epidermis: reproducibility for 50 chemicals tested with two protocols. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(4):401-16.
32. Bartek MJM, Labudde JJA, Maibach HIH. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol*. 1972;58(3):114-123.
33. Hadgraft J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm*. 2004;58(2):291-299.

34. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, *et al.* Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Ski Res Technol.* 2007;13(1):19-24.
35. Meyer W, Kacza J, Zschemisch N-H, Godynicki S, Seeger J. Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Ann Anat.* 2007;189(2):143-56.
36. SCCS. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. *Sci Comm Consum Saf.* 2010;(SCCS/1358/10).
37. Chevari S, Likhner D. Complex formation of natural uranium in blood. *Med Radiol (Mosk).* 1968;13(8):53-7.
38. Kort JJ, Aslanyan S, Scherer J, Sabo JP, Kohlbrenner V, Robinson P. Effects of tipranavir, darunavir, and ritonavir on platelet function, coagulation, and fibrinolysis in healthy volunteers. *Curr HIV Res.* 2011;9(4):237-46.
39. Gujjar M, Banga AK. Vehicle influence on permeation through intact and compromised skin. *Int J Pharm.* 2014;472(1-2):362-8.
40. Mohammed YH, Yamada M, Lin LL, *et al.* Microneedle enhanced delivery of cosmeceutically relevant peptides in human skin. *PLoS One.* 2014;9(7):e101956.
41. Paleco R, Vučen SR, Crean AM, Moore A, Scalia S. Enhancement of the in vitro penetration of quercetin through pig skin by combined microneedles and lipid microparticles. *Int J Pharm.* 2014;472(1-2):206-13.
42. Singer M, Tjeerdema R. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1993;133:95-149.
43. Lonnemann G, Endres S, Van der Meer JW, Cannon JG, Koch KM, Dinarello CA. Differences in the synthesis and kinetics of release of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and tumor necrosis factor from human mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 1989;19(9):1531-6.

PARTIE 2



Evaluation *in vivo* du potentiel de la nanoémulsion de
1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène
pour le traitement de peaux présentant des lésions
superficielles et contaminées par une solution chargée en
uranium



La première partie de ce chapitre a permis de démontrer l'efficacité *ex vivo* de la nanoémulsion de calix[6]arène sur des peaux contaminées présentant des lésions superficielles, en comparaison au traitement de référence que constitue l'utilisation de l'eau savonneuse en cas de contamination cutanée. De plus, les études menées *in vitro* sur des épidermes humains reconstitués ont permis de s'assurer de la bonne tolérance cutanée de celle-ci après application, même prolongée. D'après l'ensemble de ces résultats, cette nanoémulsion de calixarène semble donc constituer un candidat potentiel pour le traitement spécifique et efficace des contaminations cutanées par l'uranium sans générer d'effet indésirable localement.

L'objectif de cette 2^{ème} partie expérimentale est donc d'étudier cette fois l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion sur un modèle *in vivo*. Pour cela, des études ont été menées chez le rat, puisqu'il constitue un modèle facile à utiliser et moins onéreux qu'un animal de plus grande taille. Au vu des précédents résultats présentés en 1^{ère} partie, il a été choisi d'étudier l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène principalement sur des rats présentant une peau lésée par excoriation et par micro-piqûres, et contaminés par du nitrate d'uranyle. Les principaux organes de rétention de l'uranium, que sont les reins et le squelette, ainsi que son excrétion urinaire et son dépôt au niveau cutané, seront le principal reflet de l'efficacité de la nanoémulsion. En effet, plus la quantité retrouvée dans ces différents échantillons sera faible, et meilleur sera le pouvoir décontaminant du traitement étudié. A l'inverse, une quantité croissante d'uranium dans les eaux de rinçage sera le marqueur d'une efficacité de décontamination accrue. L'efficacité de la nanoémulsion est alors comparée au traitement de référence qu'est l'eau savonneuse (Trait rouge®).

L'ensemble des résultats obtenus *in vivo* a ainsi pu démontrer une meilleure efficacité de la nanoémulsion en comparaison à un traitement classique par de l'eau savonneuse, bien que la chélation spécifique due à la présence du calixarène dans la formulation ne soit pas à nouveau démontrée. En effet, contrairement aux études *ex vivo* précédemment menées, où le ratio calixarène / uranium était favorable à la chélation spécifique du radionucléide par la molécule de calixarène (ratio de 81), ce même ratio était bien plus faible (ratio de 40) lors des études *in vivo*.

Publication 2: Compared *in vivo* efficiency of calixarene nanoemulsion and soaped water in the treatment of superficial wounds contaminated by uranium

A soumettre

**Sophie Grivès^{1,2,3}, Guillaume Phan^{3*}, Céline Bouvier-Capely³, David Suhard³, Christine Tessier³,
François Rebière³, Michelle Agarande³, Elias Fattal^{1,2}**

¹ Université Paris-Sud, Faculté de pharmacie, Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

² CNRS, UMR 8612, 5 rue JB Clément, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

³ Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-Hom, SDI, Laboratoire de RadioChimie, 31 avenue de la Division Leclerc, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

No emergency decontamination treatment is currently available in the case of radiological skin contamination by uranium compounds. Internal contamination through skin has however to be addressed for the first responders at the workplace, but also during an industrial nuclear accident. For that reason, a calixarene nanoemulsion was developed for the treatment of intact skin or superficial wounds contaminated by uranium, and the decontamination efficiency of this nanoemulsion was investigated *in vitro* and *ex vivo*. The present work addresses the *in vivo* decontamination efficiency of this nanoemulsion, using a rat model. This efficiency is compared to the radio-decontaminant soaped water currently used in France (Trait rouge®) at the workplace. The results showed that loaded and non-loaded nanoemulsions allowed a significant decontamination efficiency compared to the treatment by soaped water. The early application of the nanoemulsion on contaminated excoriated rat's skin allowed decreasing uranium content around 85% in femurs, 95% in kidneys and 93% in urines. For micro-needles wounded skins, mimicking wounds by micro-stings, nanoemulsions allowed around 94% of decrease in uranium retention in kidneys. Moreover, these studies showed that soaped water treatment potentiates the transcutaneous passage of uranium

Key words

Decontamination, uranium, wounded skin, calixarene, nanoemulsion, soaped water

1. Introduction

Skin contamination, together with inhalation, is the most frequent contamination modes in nuclear industry. Indeed, cutaneous contamination by radionuclides such as uranium compounds on intact or wounded skin is a significant source of exposure ¹, and may lead to the actinide incorporation into the body through the bloodstream. Nevertheless, no treatment is available in order to prevent the percutaneous passage of diffusible uranium, such as uranyl ions, although the radionuclide can pass through intact skin in less than fifteen minutes and diffuse to the bloodstream only thirty minutes after the contamination occurs ². Many studies have shown that uranium transcutaneous diffusion was function of skin integrity, since lesions of the *stratum corneum* induced an increased bioavailability of uranium ²⁻⁴. Thus, an initial external contamination will induce internal exposure of the victim to uranium, a part of which will be directly eliminated by urinary excretion, the other part being stored in retention organs which are kidneys and bones ⁵⁻⁸. This uranium retention in the target organs can cause both chemical and radiological toxicities ⁹⁻¹³.

In practice, in case of cutaneous contamination, the only treatment currently available in French nuclear industry consists in rinsing the contaminated area with warm water and soap ^{14,15}. However these procedures are not specific for trapping radionuclide, and no efficient treatment for cutaneous contamination due to uranium exists, neither chemically nor regarding the wound anatomical site, although contamination can occur through wounds which can be difficult to decontaminate. If there is a suspected internal contamination after cutaneous contamination, one or several intravenous injections of a Ca-DTPA solution can be performed after transfer of the victim to the medical department, in order to promote the urinary excretion of radionuclides such as transuranic actinides ¹. However, this decorporating agent is not efficient for specific chelation of uranium in the body, and may adversely potentiate its nephrotoxic effects ^{16,17}.

A local treatment strategy, directly applied on the contaminated area, seems to be the most effective way to reduce the radionuclides absorption after cutaneous contamination ¹⁸. Several previous studies have been conducted to this end, especially leading to the development of hydrogel treatments. The authors demonstrated a significant decrease of renal uranium uptake thanks to the retention of the radionuclide within the hydrogel at the contaminated sites ^{19,20}. However, the improvement of the gel efficiency by the addition of specific chelating agents was not demonstrated ^{19,20}, or even reduced the decontaminating effect of the gel itself ²¹. Indeed, the observed efficiency resulted to a non-specific physical absorption of contaminated solution in the formulations ²¹, and this may induce the release of uranium from the gels at any time. New specific chelating agents were investigated in order to treat cutaneous uranium contamination. This is particularly the case of phosphorus organic compounds such as ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) ²²⁻²⁴. *Ex vivo* and *in vivo* studies showed that EHBP was a more efficient

decontaminating agent than DTPA after a local treatment following contamination accident with uranyl nitrate solution. However, it appeared that if the skin was not rinsed after the local application of the chelating agent, the radionuclide-EHBP complexes diffuse towards the lowest skin layers in larger proportions than the DTPA-radionuclide complexes. This diffusion phenomenon could lead to a distribution of the complex in the bloodstream ²⁵. In other studies, other bisphosphonate molecules, such as pamidronate, were used as uranyl ions ligands and incorporated in hydrogels ¹⁹. All formulations showed decontamination efficiency but no clear effect of the chelating agents was demonstrated as no hydrogels without chelating agents were tested as control treatments. This efficiency could be associated to the absorbing capacity of the hydrogel. Consequently, no actual efficient treatment can be used for uranium cutaneous contamination.

In this context, we developed a new emergency treatment to be used in case of uranium cutaneous contamination, consisting of an oil-in-water (O/W) nanoemulsion comprising calixarene molecules ²⁶, a specific chelating agent of uranium ^{27–29}. Previous studies on *ex vivo* models, using intact and superficially wounded and contaminated skin explants, demonstrated the efficiency of this formulation ^{30,31}. The cutaneous safety of this calixarene nanoemulsion was also demonstrated by *in vitro* studies on reconstructed human epidermis ³¹.

The aim of the present studies was to evaluate the *in vivo* decontamination efficiency of this calixarene nanoemulsion. For this purpose, rat models were used and contaminated on their back skin which was at first superficially wounded by excoriation or stings. Indeed, internal contamination by actinides following wounding, such as incision, may occur in nuclear industry workers or subsequent to terrorist activities ³². On this animal model, decontamination efficiency of our calixarene nanoemulsion was compared to the reference radio-decontaminant treatment used in French nuclear industry: Trait rouge[®] soaped water.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arene called calixarene here (Figure 1) was synthesized as described in the patent ³³. Other compounds used for preparing calixarene nanoemulsions were paraffin oil ($d = 0.86$, VWR, Fontenay-sous-Bois, France), non-ionic surfactants sorbitan monooleate (Span[®] 80) and polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween[®] 80), both purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Demineralized water was obtained from a Milli-Q[®] Synergy 185 water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Uranium-contaminated solution was prepared from depleted uranium (1,000 mg.L⁻¹ in 2% HNO₃) purchased from SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon (Longjumeau, France), to a final concentration of uranium at

0.04 g.L⁻¹ pH 5. Isotopic composition was 0.0013% of ²³⁴U, 0.3% of ²³⁵U and 99.6987% of ²³⁸U. The digestion of organs was carried out with 67% HNO₃ stock solution and 30% H₂O₂ (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), using the ETHOS One[®] microwaves oven (Milestone Srl, Sorisole, Italy). The following reagents and standards were used for ICP-MS measurements: 67% HNO₃ stock solution (Normatom, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) and a spike isotopic reference material containing ²³³U and ²³⁶U with a certified amount ratios $n(^{233}\text{U})/n(^{236}\text{U})$ of 1.01906(16) was purchased from Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (Geel, Belgium).

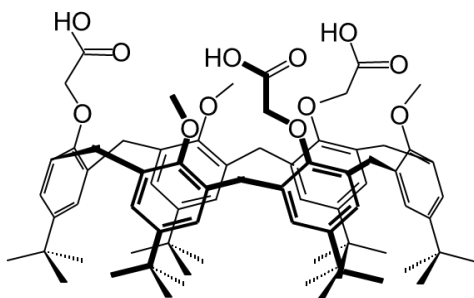


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arene

2.2. Preparation and characterization of calixarene-loaded nanoemulsion

The emulsion inversion point method was used to prepare the O/W calixarene nanoemulsion as previously described ²⁶. Briefly, water was added dropwise into a mixture of paraffin oil (20%) and surfactants (5%) under stirring at 50°C. Calixarene was added to the oily phase at a concentration of 4 mg.g⁻¹. The dispersed oil droplet size and zeta potential were both measured with a Nanosizer/Zetasizer[®] ZS apparatus (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), and pH measurements were carried out with a MeterLab/pH M240 pH-meter (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

2.3. *In vivo* studies

2.3.1. Animals

3-months-old male Sprague Dawley rats purchased from Charles River Laboratories, (Saint Germain sur l'Arbresle, France) were handled according to the French Legislation and the European Directives regarding the care and use of laboratory animals. Experimental protocols were validated by the IRSN Ethics Committee. Rats were housed individually in metabolic cages for a 2-day period of acclimation ahead of the experiment. They had free access to water and food before and throughout the experimental period. After exposure, the animals were anaesthetized by isoflurane inhalation.

2.3.2. Wounded skin contamination procedure

Back of animals were shaved one day before the beginning of the study to delimit a decontamination area, previously depilated using a depilating cream (Veet® sensitive skin), and then were thoroughly rinsed with water at room temperature before the wounding simulation and contamination steps.

Two different types of superficial wounds were simulated as previously described³¹ by excoriation obtained after 5 tape strips that led to the *stratum corneum* removal, and by superficial sting induced by applications of microneedles of 0.7 mm of length (Dermaroller®, Wolfenbüttel, Germany). A total number of 12 applications of an array containing twelve microneedles were regularly performed on a delimited area of back skin in each rat from the groups of superficial sting-wound model.

The skin area to be contaminated was delimited by a dermal exposure device consisting of a polytetrafluoroethylene (PTFE) ring (outside diameter: 21 mm; inside diameter: 16 mm; height: 8 mm) stuck on the back of each rat with the tissue adhesive Histoacryl purchased from B. Braun Medical France (Boulogne, France)⁴. 250 µL of the 0.04 g.L⁻¹ uranium contaminating solution (10 µg of uranium) were deposited on the skin and this area was immediately treated with 500 µL of loaded nanoemulsion (4 mg.g⁻¹ calixarene), allowing a calixarene/uranium molar ratio of 40. Contaminated control animals were treated with an unloaded nanoemulsion or with the currently used radio-decontaminant soap Trait rouge®, manufactured by SORIFA laboratory (Ostwald, France) which was diluted 10 fold in water before use. Non-contaminated control animals were exposed to an acetate buffer solution following the same procedure used for contaminated animals.

The exposure device was closed with a piece of Parafilm stuck on the PTFE ring. The whole system was maintained on the rat with an Elastoplaste adhesive bandage purchased from BSN Medical S.A.S. (Vibraye, France). Rats were housed in metabolism cages during 48 h after the beginning of exposure, and were then euthanized. Non-contaminated control groups of animals were handled in the same conditions as contaminated animals.

2.3.3. Sample collection

Urine samples were collected from each rat at 24 and 48 h. At the end of the experiment, rats were euthanized by intracardiac whole blood sampling puncture under isoflurane anesthesia. Contaminated skin area was washed twice with 1 mL of ultrapure water. Back skin, left-side kidneys and femurs were sampled, weighted, and stored at 4°C until analysis for uranium content. The sample collection procedure was exactly the same as far as contaminated and uncontaminated control animals were concerned.

2.3.4. Sample analysis by ICP-MS

After a previous dilution in 2% nitric acid solution of each urine samples, ^{238}U was directly measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, Agilent 7700x) using optimized protocols originally designed for human urine samples^{27,34,35}. In each samples 100 μL of $^{233/236}\text{U}$ solution were added as internal standard to quantify uranium by isotope dilution method to avoid the matrix effect induced by urine or the different organs. Indeed, skins, kidneys and femurs samples were previously mineralized by microwaves with 67% HNO_3 stock solution and 30% H_2O_2 in 4:1 v/v ratio at 200°C during 30 min, and then analyzed for uranium content as the urine samples by ICP-MS measurement after an appropriate dilution in 2% nitric acid solution. Uranium content in rinse waters were also measured by the same method. The cumulative amounts of uranium excreted in urines during the 48 h of exposure were compared between each group, as well as the amount of uranium recovered at the end of the 48 h experiment in rinse waters, skin explants, kidneys and femurs.

2.3.5. Localization of uranium in skin biopsies by SIMS microscopy

After the exposure phase, skin samples (approximately 1 mm^3) underwent a classical chemical fixation procedure in Leica EM-AMW automates. They were fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer one day at 4°C, then dehydrated in various ethanol baths and permeated in an acetone/epon mixture. Finally they were embedded in pure epon-type resin. Serial thin sections (1 μm) included in resin were cut and laid either on polished ultrapure silicon holders to avoid relief effects and minimize charge effects for SIMS analysis, or on glass slides for histological controls with an optical microscope. The SIMS analyses were performed with a CAMECA IMS 4F E7 Instrument. For each area analyzed, mass spectra at around the mass of isotope 238 of uranium, and ionic images were obtained. $^{40}\text{Ca}^+$ images give the histological structure of the cutaneous layers, and $^{238}\text{U}^+$ images show uranium micro-distribution within the structures.

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) of the number of animals used for each experiment group. The statistical analysis of results was performed using Student t test and p value less than 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Uranium quantity in rat tissues

Cutaneous decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion was studied on rats which were superficially wounded according to two different models: by excoriation, or by superficial stings carried out with microneedles. Calixarene nanoemulsion or control treatments such as unloaded nanoemulsion and

soaped water were immediately applied after uranium skin contamination of rats. 48 h after the beginning of uranium exposure, animals were euthanized and principal retention organs (kidneys and femurs) were sampled together with urines, skin explants contaminated and rinse waters, in order to quantify uranium content (Figure 2).

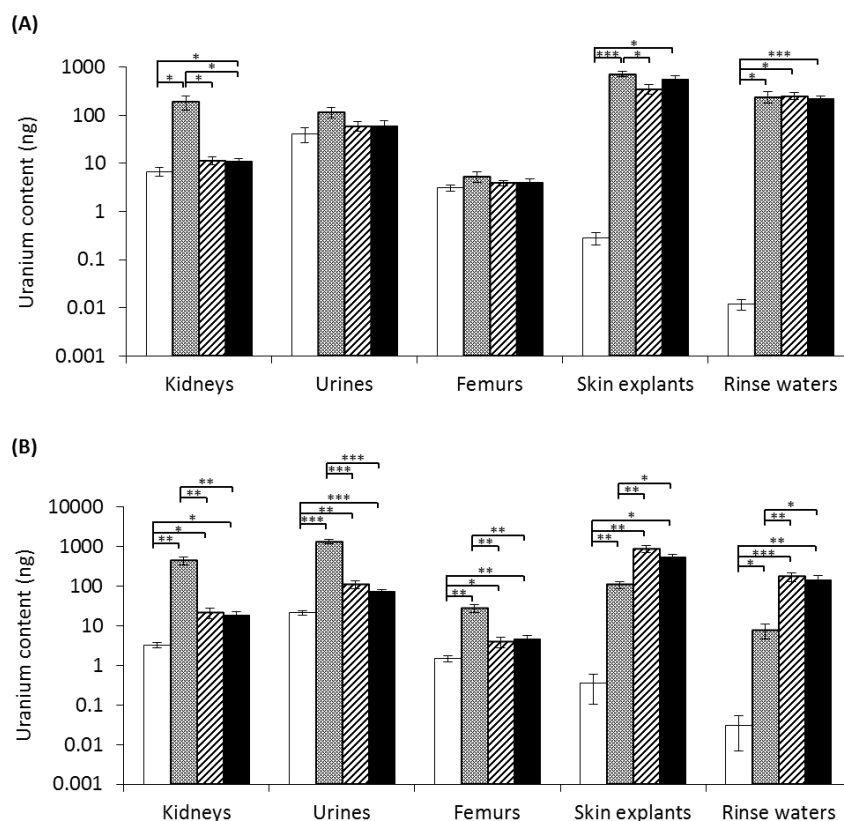


Figure 2: Amount of uranium in kidneys, urines, femurs, skin explants and rinse waters at the end of the 48 h-experiments, as function of the treatment applied: ■ soaped water (reference treatment); ▨ unloaded nanoemulsion; ■ calixarene nanoemulsion. The negative control corresponds to: □ non-contaminated animals. Results are given for two types of wounded skin: (A) Wounds made by microneedles; (B) Excoriated skin. Results are presented as the mean of a minimum of 6 values \pm SEM ; * = significantly different with $p < 0.05$ (Student t test); ** = significantly different with $p < 0.01$ (Student t test); *** = significantly different with $p < 0.001$ (Student t test).

3.1.1. After contamination on skin wounded by superficial stings

The results of uranium quantification in the samples are presented in figure 2A.

Kidneys and urines. The quantity of uranium in kidneys was significantly higher in the group treated by soaped water (191.2 ± 63.3 ng) than in nanoemulsion groups (11.4 ± 2.2 ng and 11.2 ± 1.2 for non-loaded and loaded calixarene nanoemulsion). Although there was no statistical difference, the same trend was observed in uranium excretion with respectively 115.7 ± 28.8 ng of uranium after soaped water treatment, and 59.6 ± 12.9 ng and 60.4 ± 15.4 ng of uranium after non-loaded and calixarene nanoemulsion treatment, in 48 h-cumulated urines. Uranium content in kidneys and urines for non-contaminated animals were respectively 6.8 ± 1.4 ng and 40.7 ± 14.2 ng.

Femurs. No statistical difference of uranium retention was observed in femur, whatever the treatment applied after the contamination of animals (with respectively 5.3 ± 1.3 ng of uranium for soaped water treatment, 3.9 ± 0.5 ng for non-loaded nanoemulsion, and 4.0 ± 0.8 ng of uranium for calixarene nanoemulsion group). 3.1 ± 0.5 ng of uranium were detected in femurs of non-contaminated rats.

Skin and rinse waters. No statistical difference of uranium retention was observed in rinse waters, whatever the treatment applied after skin contamination (respectively 243.1 ± 65.9 ng of uranium for soaped water group, 251.9 ± 41.6 ng for non-loaded nanoemulsion group, and 222.5 ± 26.2 ng for calixarene nanoemulsion group). The same trend was observed for uranium retained in the skin with respectively 712.1 ± 90.5 ng of uranium for soaped water group, 354.1 ± 81.9 ng for non-loaded nanoemulsion group, and 563.9 ± 106.1 ng for calixarene nanoemulsion group, although there is a significant statistical difference between soaped water group and non-loaded nanoemulsion group. 0.02 ± 0.003 ng and 0.3 ± 0.08 ng of uranium were detected in rinse waters and non-contaminated skins.

3.1.2. After contamination on excoriated skin

The results of uranium quantification in the samples are presented in [figure 2B](#).

Kidneys and urines. The quantity of uranium in kidney was significantly higher in the group treated by soaped water (438.3 ± 91.9 ng) than in nanoemulsion groups (21.6 ± 6.7 ng and 18.3 ± 3.9 ng for non-loaded and loaded calixarene nanoemulsion). The same trend was observed in uranium excretion with respectively 1318.7 ± 6.0 ng of uranium after soaped water treatment, and 110.7 ± 1.2 ng and 74.4 ± 1.2 ng of uranium after non-loaded and calixarene nanoemulsion treatment, in 48h-cumulated urines. Uranium content in kidneys and urines for non-contaminated animals were respectively 3.3 ± 0.6 ng and 21.4 ± 2.7 ng.

Femurs. The same trend as in kidneys and urines was observed concerning the uranium retention in femur of animals, which was significantly higher for contaminated animals treated by soaped water (27.7 ± 6.0 ng) than by loaded or unloaded calixarene nanoemulsion (respectively 4.6 ± 1.2 ng and 4.0 ± 1.2 ng). 1.5 ± 0.3 ng of uranium were detected in femurs of non-contaminated rats.

Skin and rinse waters. At the deposit area, quantity of uranium retained in the skin was largely dependent on the treatment applied, as well as in rinse waters. Indeed, in contrast to tissues, a larger quantity of uranium was observed for nanoemulsion groups (with respectively 870.7 ± 163.5 ng and 555.1 ± 60.3 ng for non-loaded and loaded calixarene nanoemulsion in skin explants, and 172.6 ± 40.8 ng and 144.5 ± 43.7 ng in rinse waters) than for soaped water group (108.4 ± 21.1 ng and 7.7 ± 3.1 ng respectively in skin and rinse waters). 0.4 ± 0.3 ng and 0.03 ± 0.02 ng of uranium were detected in non-contaminated skins and rinse waters.

Whatever the organs or tissues concerned, and whatever the treatment applied, a greater quantity of uranium was observed in contaminated animals than in non-contaminated ones, for which the amount of detected uranium corresponds to the natural uranium content.

3.2. Localization of uranium in skin

Visualization of uranium in the skin structures of animals 48 h after contamination and treatment with soaped water Trait rouge®, both on excoriated and skin wounded by micro-stings, were achieved using the SIMS microscopy technique (Figure 3). Indeed, ion microscopy is an appropriate analytical method for trace elements and can give elemental cartography in a biological tissue section³⁶.

In case of skin wounded by microneedles, the SIMS mass spectra and $^{238}\text{U}^+$ and $^{40}\text{Ca}^+$ ions images (Figure 3A) showed the presence of *stratum corneum*, and an accumulation of uranium therein. Uranium was also detected around invaginations formed by the hair follicles, and no more uranium was observed at the lower layers of the skin in SIMS experimental conditions (data not shown).

Skin sample removed from excoriated skin rat contaminated and treated by soaped water showed (Figure 3B) the presence of uranium traces at the upper layer of the skin where some parts of *stratum corneum* still remained. No uranium was detected by the technique in the lower layers of the skin explant (data not shown). Moreover, histological cutaneous structure showed a disruption in the upper layer of the epidermis for this last group.

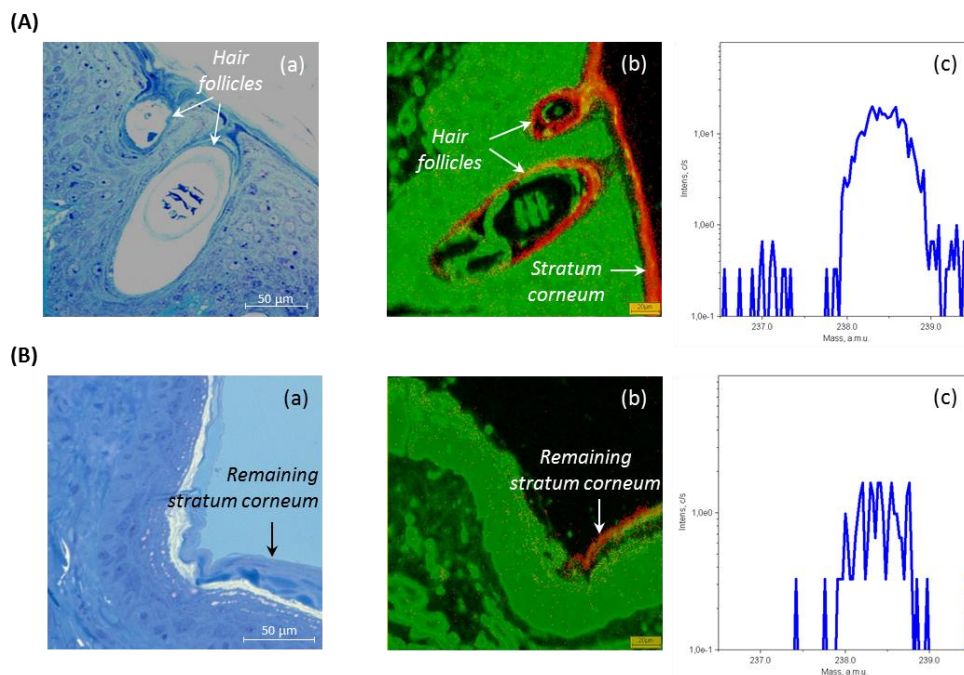


Figure 3: Superposition of ion images of the upper layers of the rat skin wounded by (A) microneedles; or (B) excoriation after uranium contamination and immediate treatment by soaped water. Biopsies were sampled at the end of the experiment (48 h). (a) Toluidine blue stained semi-thin section of skin rat ; (b) Superposed ionic images $^{238}\text{U}^+$ (red) and $^{40}\text{Ca}^+$ (green) ; (c) corresponding $^{238}\text{U}^+$ mass spectra.

4. Discussion

A calixarene nanoemulsion was previously designed and proved *ex vivo* ability to remove uranium from intact or superficially wounded skin after contamination^{26,30,31,37}. In this present study, we aim to demonstrate the potentiality of this formulation in preventing the diffusion of uranium through superficial wounded skin on *in vivo* model carried out on the dorsal skin of rats, which is the most common and readily used animal model³⁸. *In vivo* experiments carried out on intact back skin of rats were previously performed^{3,4} and showed that the diffusion of uranium was both slow and low regularly along the 24 h exposure, since uranium could not be detected in the blood during 24 h. Uranium was nonetheless detected only 6 h after the beginning of exposure in the kidneys, and after 24 h in urines. In addition, this passage could be significantly increased in case of wounded contaminated skin. Since contamination frequently occurs through wounds in the industry³⁹, our aim was to evaluate the decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion on physical wounds models. For this purpose, and in order to be in penalizing conditions that potentiate the passage of uranium through the skin, we chose to study this decontamination efficiency on rat skins on which two different types of superficial wounds were generated: by excoriation, or by superficial stings induced by microneedles. Besides, the contamination was applied after the wounding step. We chose to compare the efficiency of the calixarene nanoemulsion to three main control groups: i) non-contaminated group, representing the natural uranium content in each tissues; ii) contaminated animals treated by the non-loaded nanoemulsion, to obtain the decontamination effect of the vehicle compared to the calixarene nanoemulsion ; and iii) contaminated animals treated by Trait rouge® soaped water, which is currently used as radio-decontaminant in French nuclear industry in case of skin contamination. 48 h after cutaneous contamination by 0.04 g.L⁻¹ uranyl nitrate solution, animals were euthanized and one femur and one kidney of each rat were sampled, the latter being the main uranium retention organs^{6,7,40,41}, thus good indicators of the uranium transcutaneous passage.

After wounding by stings induced by micro-needles and contaminating the back skin of rats, a significant decrease of uranium accumulation in kidneys was observed (Figure 2A) after nanoemulsions treatments, with a decrease of renal uranium uptake of approximately 94%, in comparison to animals treated with the standard treatment recommended by the authorities that is soaped water⁴². The same trend was observed in the urinary excretion of 48 h, with a decrease, although not statistically significant, of 48%. These experimental conditions, however, did not allow evaluation of the specific effect of calixarene molecules included in the nanoemulsion, since the amount of uranium in kidneys, femurs and urines of contaminated animals treated by the nanoemulsions reached the baseline. Indeed, they were similar to the amounts of uranium naturally present in organs of non-contaminated animals. We assume that the amount of uranium recovered in main retention organs would have been higher if uranium was applied in larger amount, which

was not favorable in our experimental conditions to demonstrate the efficiency of the calixarene within the nanoemulsion (minimum required calixarene/uranium molar ratio).

Finally, none of the treatments studied did interfere to the uranium content in skin explants from contaminated area, and in rinse waters. This can be explained by the presence of the entire *stratum corneum* on the skin as shown by studies using SIMS microscopy (Figure 3A), since superficial sting induced skin lesion without removing its protective barrier which is the *stratum corneum*. This horny layer can then acts as a reservoir of uranium and allow a delayed biodistribution⁴. The rinsing made with the calixarene nanoemulsion was however not repeated to increase its decontamination effect since previous *ex vivo* studies on intact skin showed that one single application of calixarene nanoemulsion prevented uranium diffusion through the *stratum corneum*⁴³.

After excoriating and contaminating the back skin of rats, the decontamination efficiency of the nanoemulsions (loaded and unloaded), in comparison to the decontamination effect obtained after treatment with soaped water as decontaminant agent, was more pronounced than in the studies on micro-stings presented above. Indeed, the results showed that these nanoemulsions prevented the transcutaneous diffusion of uranium and thus its distribution in the body, hence reducing the risks of toxicity associated to this incorporation. In fact, the application of nanoemulsion immediately after the cutaneous contamination of rats allowed a decrease of uranium retention around 85% in femurs and around 95 % in kidneys, in comparison to animals treated by conventional soaped water. Urinary excretion of this radionuclide was also very significantly lowered with a decrease of about 93%. It was also observed a lower amount of uranium in rinse waters and in skin from animals treated by soaped water compared to those treated by nanoemulsions. The oil-in-water formulation of the nanoemulsion can explain the complexation efficiency allowing the uranium extraction from the contaminated solution by the nanoemulsion, including an increase of uranium amount in rinse waters in this case, in comparison to a treatment with soaped water. Moreover, soaped water would favor the uranium transcutaneous diffusion in the absence of *stratum corneum* presumably by permeabilization of cell membranes induced by the large amount of ionic surfactants (such as sodium laureth sulfate and cocamidopropyl betaine for example), explaining the disruption of the upper layers of the epidermis showed by histological images. This would explain the low amount of uranium in the skin of animals belonging to this group, either after uranium quantification by ICP-MS method (Figure 2B) or after uranium localization by SIMS microscopy (Figure 3B).

Unlike *ex vivo* studies previously carried out^{30,31}, the contribution of the calixarene molecule as a chelating agent in the nanoemulsion could not be demonstrated in these *in vivo* studies. This was particularly due to the low molar calixarene / uranium ratio achievable, which did not allow a large excess of chelating agents to fully complex uranium. Indeed, the amount of uranium used was fixed as a compromise to show

sufficient internal contamination. However, it was previously demonstrated the need to be in large excess of calixarene with at least a molar ratio of 2,000 to be most efficient in chelating uranium⁴³, while the maximum ratio achievable in the present *in vivo* studies was only of 40. Besides, it was not technically possible to increase this ratio because of the constraints of the animal model used here, which did not allow modulating the deposited volumes. Hence, the use of another system allowing a larger area of contamination could be envisaged to increase the volume of the nanoemulsion, and so the calixarene / uranium molar ratio. *In vivo* efficiency study of the calixarene nanoemulsion could also be conducted in a larger animal model such as mini-pig for example. However, the standard deviations obtained in this work after treatment with non-loaded nanoemulsion (data not shown) was higher than those obtained after calixarene nanoemulsion treatment. This allows the hypothesis of a better specific chelation of loaded nanoemulsion, thus reducing the variability of inter-individual response.

5. Conclusion

From these studies, nanoemulsions developed allowed a better efficiency of uranium decontamination on superficial wounded skin than the current treatment used consisting of soaped water (Trait rouge® in France), especially after a contamination occurring on excoriated skin. Indeed, after applying these treatments immediately after cutaneous contamination, a decrease of uranium retention was observed in femurs, reflecting the amount of uranium in the skeleton, and in kidneys, these two organs being the main retention organs of uranium. A decrease of the quantity of uranium detected in urines was also observed. Uranium retention was ascertained in the *stratum corneum*, the latter being a uranium reservoir, as it has been shown by previous studies. Furthermore, soaped water treatment potentiated the passage of uranium through superficial wounded skin in our experimental conditions. However, unlike *ex vivo* models previously used, this *in vivo* model did not allow favorable experimental conditions in order to show the calixarene contribution on the decontamination efficiency, since the molar ratio between calixarene and uranium was too low. The main perspective of this study will consist in optimizing the experimental protocol in larger animals such as the mini-pig for example. Besides, as carboxylic calixarene molecules are also known to complex actinides such as americium or plutonium, the efficiency of the calixarene nanoemulsion could be evaluated *ex vivo* and *in vivo* in case of cutaneous contamination due to these transuranic elements.

6. Acknowledgments

The authors would like to thank all animal scientists from Pierrelatte, France, for animals care throughout the present study, Mrs. Annabelle Manoury (IRSN, Laboratoire de RadioChimie) for her help for organs mineralization. Research funds were granted by the Direction Générale pour l'Armement (DGA) and the Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).

References

1. Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, *et al.* Exposure to actinides : report on Ca-DTPA injections in CEA-AREVA centres. *Radioprotection*. 2007;42:163-196.
2. Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82(2):133-139.
3. Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat Prot Dosim*. 2007;127(1-4):125-130.
4. Petitot F, Frelon S, Moreels AM, *et al.* Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Heal Phys*. 2007;92(5):464-474.
5. Bleise A, Danesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact*. 2003;64(2-3):93-112.
6. Hengé-Napoli MH, Ansoborlo E, Houpert P, *et al.* Progress and Trends in In Vivo Chelation of Uranium. *Radiat Prot Dosimetry*. 1998;79(1):449-452.
7. Leggett RW, Pellmar TC. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J Environ Radioact*. 2003;64(2-3):205-225.
8. Souidi M, Tissandie E, Racine R, *et al.* Uranium: Properties and biological effects after internal contamination. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009;67(1):23-38.
9. Diamond G. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundam Appl Toxicol*. 1989;13(1):65-78.
10. Ozmen M, Yurekli M. Subacute toxicity of uranyl acetate in Swiss-Albino mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1998;6(2):111-115.
11. De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environ Res*. 1983;30(2):480-491.
12. Kathren RL, Burklin RK. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys*. 2008;94(2):170-179.
13. Wade-Gueye NM, Delissen O, Gourmelon P, Aigueperse J, Dublineau I, Souidi M. Chronic exposure to natural uranium via drinking water affects bone in growing rats. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(7):1121-7.
14. IAEA. *Assessment and Treatment of External and Internal Radionuclide Contamination*. (IAEA-TECDO, ed.); 1996. Accessed October 30, 2014.
15. IAEA E. Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency. *EPR-MEDICAL, Vienna: IAEA-WHO*. 2005. Accessed October 30, 2014.
16. Houpert P, Muller D, Chazel V, Claraz M, Paquet F. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat Prot Dosimetry*. 2003;105(1-4):517-20.
17. Muller D, Houpert P, Henge-Napoli MH, Metivier H, Paquet F. Potential synergy between two renal toxicants: DTPA and uranium. *Radioprotection*. 2006;41(4):413-420.

18. Houpert P, Chazel V, Paquet F, Bailly T, Burgada R, Henge-Napoli MH. Reduction of uranium transfer by local chelation in simulated wounds in rats. *Hum Exp Toxicol*. 2001;20(5):237-241.
19. Xu K, Ge W, Liang G, *et al*. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *Int J Radiat Biol*. 2008;84(5):353-362.
20. Yang Z, Xu K, Wang L, *et al*. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chem Commun*. 2005;(35):4414-4416.
21. Houpert P, Chazel V, Paquet F. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2004;82(2):73-78.
22. Ubios A, Braun E, Cabrini R. Lethality due to uranium poisoning is prevented by ethane-1-hydroxy-1, 1-biphosphonate (EHBP). *Health Phys*. 1994;66(5):540-4.
23. Ubios A, Braun E, Cabrini R. Effect of biophosphonates on abnormal mandibular growth of rats intoxicated with Uranium. *Health Phys*. 1998;75(6):610-613.
24. Tymen H, Hoffschir D, Gerasimo P, Marty J-P. Efficiency of etidronic acid in the case of cutaneous radiocontamination by actinid elements: in vitro evaluation. *Ann Pharm Fr*. 2000;58(6):405-413.
25. Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D, Tymen, P. Gerasimo, D. Hoffschir H. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol*. 2000;76(10):1417-1424.
26. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *J Pharm Sci*. 2010;99(3):1375-1383.
27. Baglan N, Cossonnet C, Trompier F, Ritt J, Bérard P. Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys*. 1999;77(4):455-461.
28. Dinse C, Cossonnet C, Baglan N, Asfari Z, Vicens J. Extraction sélective des actinides : application à l'analyse radiotoxicologique. *Radioprotection*. 1997;32(5):659-671.
29. Bouvier-Capely C, Manoury A, Legrand A, Bonthonneau JP, Cuenot F, Rebière F. The use of calix[6]arene molecules for actinides analysis in urine and drinking water: An alternative to current procedures. *J Radioanal Nucl Chem*. 2009;282(2):611-615.
30. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, *et al*. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79(2):258-267.
31. Grivès S, Phan G, Morat G, Suhard D, Rebière F, Fattal E. Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *Submitted*. 2015.
32. Griffiths NM, Wilk JC, Abram MC, *et al*. Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys*. 2012;103(2):187-94.
33. Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B. Para-tertio-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations, French Patent. 2006;(FR-2006/001105).

34. Bouvier-Capely C, Baglan N, Montegue A, Ritt J, Cossonnet C. Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. *Heal Phys.* 2003;85(2):216-219.
35. Bouvier-Capely C, Ritt J, Baglan N, Cossonnet C. Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Appl Radiat Isot.* 2004;60(5):629-633.
36. Tessier C, Suhard D, Rebière F, Souidi M, Dublineau I, Agarande M. Uranium microdistribution in renal cortex of rats after chronic exposure: a study by secondary ion mass spectrometry microscopy. *Microsc Microanal.* 2012;18(1):123-33.
37. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. A new formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination. *Health Phys.* 2010;99(3):430-434.
38. Bartek MJM, Labudde JJA, Maibach HIH. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *J Invest Dermatol.* 1972;58(3):114-123.
39. Grappin L, Bérard P, Menetrier F, *et al.* Treatment of actinide exposures: A review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiat Prot Dosimetry.* 2007;127(1-4):435-439.
40. Bernard SR, Struxness EG, Laboratory ORN. *A study of the distribution and excretion of uranium in man: an interim report.*; 1957:63.
41. Durbin PW, Kullgren B, Xu J, Raymond KN. Development of Decorporation Agents for the Actinides. *Radiat Prot Dosimetry.* 1998;79(1-4):433-443.
42. French Nuclear Safety Authority (ASN). Guide national - Intervention médicale en cas d'événement nucléaire ou radiologique. 2008.
43. Spagnul A, Bouvier-Capely C, Adam M, Phan G, Rebière F, Fattal E. Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion. *Int J Pharm.* 2010;398(1-2):179-84.

• • • •

Discussion générale

• • • •

En cas de contamination cutanée par l'uranium, deux stratégies peuvent être mises en œuvre. La première est la décontamination cutanée, qui consiste à éliminer l'uranium de la zone contaminée avant que celui-ci ne diffuse au travers des différentes strates de la peau, limitant ainsi son incorporation dans l'organisme et sa toxicité. La diffusion percutanée de l'uranium étant très rapide, de l'ordre de 15 min seulement pour atteindre le derme, et de 30 min pour se retrouver dans la circulation sanguine (De Rey *et al.* 1983, Petitot *et al.* 2007a), il est nécessaire que le traitement de décontamination cutanée soit un traitement d'urgence, pouvant être appliqué immédiatement par la victime ou les personnes l'entourant. La deuxième stratégie en cas d'incident de contamination cutanée est la décorporation, l'objectif étant dans ce cas d'accélérer l'excrétion urinaire du radioélément. Pour cela, une ou plusieurs injections intraveineuses d'agents chélatants tel que le DTPA seront réalisées après transfert de la victime au service médical (Bhattacharyya *et al.* 1995, Grappin *et al.* 2007a). Cependant, l'utilisation du DTPA est très discutée car il pourrait entraîner une déplétion en oligo-éléments tels que le zinc, le magnésium et le manganèse, de par sa chélation spécifique (Grappin *et al.* 2007b). Il pourrait également, en cas de contamination par l'uranium, potentialiser ses effets néphrotoxiques (Houpert *et al.* 2003, Muller & Houpert 2006).

Dans ce contexte, il est apparu nécessaire qu'un traitement d'urgence soit mis à la disposition des travailleurs de l'industrie du nucléaire en cas de contamination cutanée par l'uranium, puisqu'actuellement seul un rinçage à l'eau savonneuse est effectué (IAEA 1996, 2005). Un manque évident de traitement de décontamination est donc constaté, alors que ce dernier permettrait de faciliter la prise en charge des victimes, et pourrait ainsi avoir un impact psychologique non négligeable. C'est pourquoi une formulation incorporant des molécules de calixarène, connues pour leur spécificité de chélation envers l'uranium (Baglan *et al.* 1999, Bouvier-Capely *et al.* 2009, Dinse *et al.* 1997, 2000), a été initialement développée en tant que traitement décontaminant. Celle-ci se présente sous la forme d'une nanoémulsion huile dans eau, chargée de 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène, et dont l'efficacité de décontamination *ex vivo* sur peau intacte et excoriée a déjà été démontrée (Spagnul *et al.* 2011). En effet, il apparaît que les molécules de calixarène ainsi véhiculées sont disponibles pour la chélation de l'uranium de par leur disposition à l'interface huile eau de la nanoémulsion.

Les objectifs de ces présents travaux de thèse ont donc été dans un premier temps de développer de nouveaux modèles de lésions cutanées superficielles qui soient reproductibles et réalistes, afin d'évaluer la capacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur des peaux contaminées présentant ces lésions. Ces études ont été réalisées à la fois sur des explants de peaux contaminées et lésées *ex vivo*, mais également chez l'animal présentant ces mêmes lésions contaminées, *in vivo*. Outre les études d'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène, sa toxicité cutanée *in vitro* a également été étudiée sur des épidermes humains reconstitués.

Cette discussion générale sera composée de deux axes principaux :

- Nous reviendrons dans un premier temps sur la pertinence des modèles d'études et le choix des différentes conditions expérimentales, et discuterons des résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse.
- Nous considérerons ensuite l'intérêt de la nanoémulsion de calixarène en tant que traitement de décontamination cutanée.

1. Pertinence des modèles d'études et conditions expérimentales

1.1. Etudes de l'efficacité de décontamination *ex vivo*

Afin d'assurer la continuité des travaux expérimentaux précédemment menés sur l'évaluation de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène au sein du laboratoire, il a été choisi de poursuivre les études *ex vivo* selon les mêmes conditions expérimentales. Ainsi au cours de ces travaux de thèse, l'ensemble des études *ex vivo* a été mené sur des explants d'oreille de porc montés en cellules de diffusion de Franz, selon un mode opératoire précédemment défini. Bien que les conditions expérimentales aient été déterminées en amont, les paragraphes suivant s'attacheront à en expliquer les choix.

Les **cellules de diffusion de Franz** ont initialement été développées pour la pharmacologie cutanée. Leur utilisation dans le cadre de l'étude du passage transdermique d'éléments radioactifs, dont notamment l'uranium, a ensuite été validée (Tymen *et al.* 2000). Facile à mettre en œuvre, ce système permet d'éviter l'utilisation, en première intention, d'un grand nombre d'animaux *in vivo*. C'est la raison pour laquelle les études initiales d'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène ont été menées sur ces modèles *ex vivo*. Pour cela, des explants de peau de la face externe d'**oreilles de porcs** ont été utilisés. Plus faciles à obtenir que des biopsies de peau humaine et moins coûteuses, ces peaux ont l'avantage de constituer un bon modèle animal, puisqu'il est le plus représentatif de la peau humaine (Jacobi *et al.* 2007).

Le choix initial du contaminant s'est porté quant à lui sur une **solution de nitrate d'uranyle**. Ce composé d'uranium, connu pour être soluble et transférable, fait partie des plus préoccupants en cas de contamination cutanée puisqu'il est capable de diffuser rapidement et fortement au travers de la peau (De Rey *et al.* 1983). Son utilisation permet donc de se mettre dans des conditions favorables au passage transcutané de l'uranium, idéales pour l'évaluation du potentiel décontaminant de la nanoémulsion de calixarène.

Une **concentration de 10 mg.L⁻¹** d'uranium a été initialement fixée pour la solution de contamination, permettant d'être au-delà de la limite de détection de l'uranium par l'appareil de mesure (ICP-MS). Le choix d'une telle concentration permet également de contrôler la quantité d'uranium déposée sur les explants de peau (6 µg) dans un volume minimal de solution (0,6 mL). Ainsi après application de la nanoémulsion, un

excès de calixarène suffisant pour garantir un rendement optimal d'extraction des ions uranyle (Spagnul *et al.* 2010) est assuré, avec un ratio molaire calixarène / uranium de 81.

Le **pH de cette solution de contamination** a été fixé à 5, en premier lieu afin d'assurer une stabilité chimique des ions uranyle en solution, qui peuvent s'hydrolyser et précipiter à des valeurs de pH plus élevées. Cette valeur du pH a également été choisie pour des raisons de maintien de l'intégrité de la peau. En effet, bien qu'en cas de contamination acide, il ait été prouvé que l'efficacité *ex vivo* de la nanoémulsion de calixarène reste inchangée si sa phase aqueuse externe est au préalable tamponnée à pH 5 (Spagnul *et al.* 2010), une telle contamination acide peut provoquer des brûlures chimiques pouvant impacter considérablement la diffusion de l'uranium au travers de la peau (Petitot *et al.* 2007a,b). Aussi, afin d'éviter la présence d'une multitude de modèles de blessures lors d'une même expérimentation, l'utilisation d'une solution de contamination à pH 5 permet de ne pas brûler la peau, cette dernière ayant un pH de surface compris entre 4,2 et 5,8.

Les études de diffusion percutanée de l'uranium en fonction des traitements appliqués ont été réalisées sur une **durée de 24 h**, durée maximale assurant le maintien de l'intégrité des explants de peau (OECD/OCDE-428 2004).

Le choix de travailler en **conditions occlusives** durant toute la durée de l'étude cinétique a été fait pour deux raisons principales. La première est d'éviter tout phénomène d'évaporation, et donc de prévenir une éventuelle concentration de la solution de contamination déposée à la surface de la peau. En effet, selon la première loi de diffusion de Fick, une variation de cette concentration peut influencer directement sur le passage percutané du composé, ici l'uranium. D'autre part, tout comme le choix de la forme physico-chimique de l'uranium en tant que contaminant, la diffusion de ce composé peut être favorisée par le maintien de conditions occlusives (Golda *et al.* 2005, Makki *et al.* 1996, Seiller & Martini 1996, Zatz 1993). L'ensemble des conditions expérimentales, favorables au passage de l'uranium au travers de la peau, est ainsi propice à l'étude de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène.

Une contamination cutanée par uranium pouvant survenir sur **peau superficiellement lésée**, il semblait important d'étudier également le potentiel décontaminant de la nanoémulsion sur des peaux présentant ce type de blessure. Pour cela, un premier modèle, largement documenté, a été utilisé : il s'agit de l'excoriation. Il permet, après applications successives de bandes adhésives à la surface de la peau, de retirer l'ensemble de la couche cornée, qui constitue la principale barrière protectrice de la peau. Reproductible, ce modèle est facile à mettre en œuvre et constitue, parmi les lésions cutanées, le modèle de blessure le plus préoccupant en terme de vitesse de translocation de l'uranium à partir du site de dépôt jusqu'aux organes cibles (Petitot *et al.* 2004, 2007a,b). Dans le cadre des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit, la mise en place de deux modèles de lésions superficielles contaminées, innovantes et

reproductibles, a été réalisée. En effet, des micro-piqûres et des micro-coupures ont été effectuées sur la surface cutanée, afin de mimer des contaminations survenant sur des peaux lésées par incisions telles que cela peut se produire dans l'industrie du nucléaire (Bailey *et al.* 2003, Bérard *et al.* 2010). Le choix de modèle de lésions superficielles n'excédant pas le millimètre a été principalement gouverné par une contrainte technique que constitue l'épaisseur des explants de peau utilisés, ne permettant pas de lésions plus profondes sous peine de les transpercer de part et d'autre.

Enfin, différents **traitements témoins** ont été appliqués après contamination cutanée, afin d'évaluer par comparaison l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène :

- L'application d'une solution de tampon acétate permet de voir l'effet de dilution provoqué par l'ajout d'un traitement. En effet, comme cela a déjà été évoqué auparavant, une modification de la concentration en uranium interfère sur la diffusion percutanée de celui-ci (1^{ère} loi de diffusion de Fick). Ce témoin négatif permet ainsi de conserver les volumes appliqués à la surface de la peau, tout en s'affranchissant d'un quelconque pouvoir complexant de la solution. L'utilisation d'une solution tamponnée a été privilégiée par rapport à l'utilisation d'eau ultrapure afin d'éviter tout phénomène de précipitation (Figure 24) qui pourrait survenir suite à une éventuelle modification de pH.
- L'application en tant que traitement de la formulation non chargée en calixarène permet d'apprécier l'efficacité de décontamination propre au véhicule que représente la nanoémulsion. En effet, une efficacité non spécifique, principalement due au système émulsionné par les tensioactifs, a été observée.
- Enfin, un traitement par de l'eau savonneuse a été réalisé, par dilution au 10^{ème} de Trait rouge®, traitement de référence recommandé par les autorités nucléaires en tant que décontaminant (Bérard *et al.* 2010, IAEA 1996, 2005). Ce dernier témoin permet ainsi de comparer le traitement à l'étude au traitement actuel.

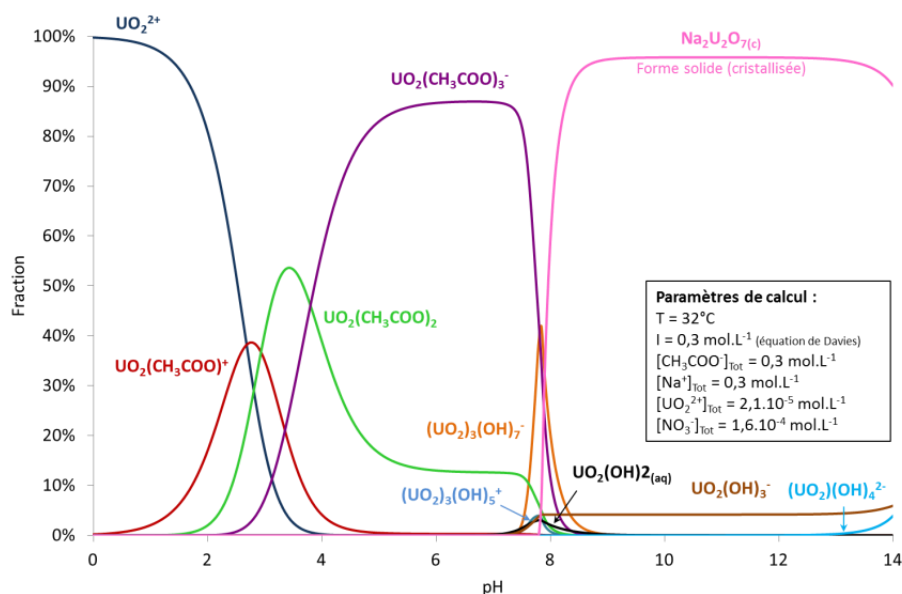


Figure 24 : Diagramme de spéciation de l'ion uranyle en tampon acétate dans les conditions expérimentales *ex vivo* (logiciel MEDUSA)

Bien que le passage transcutané de l'uranium observé en cas de blessures par micro-piqûres ou microcoupures soit faible, comme le montre la figure 25, l'ensemble de ces études *ex vivo* a permis de confirmer l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion, par rapport à une simple dilution, ou encore en comparaison avec le traitement de référence qu'est l'eau savonneuse. Toutefois, l'absence de résorption sanguine de l'uranium et de sa répartition dans les différents organes rend ce modèle *ex vivo* limitant. C'est pourquoi, suite à ces résultats prometteurs, il a été choisi de poursuivre l'évaluation de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur un modèle *in vivo*.

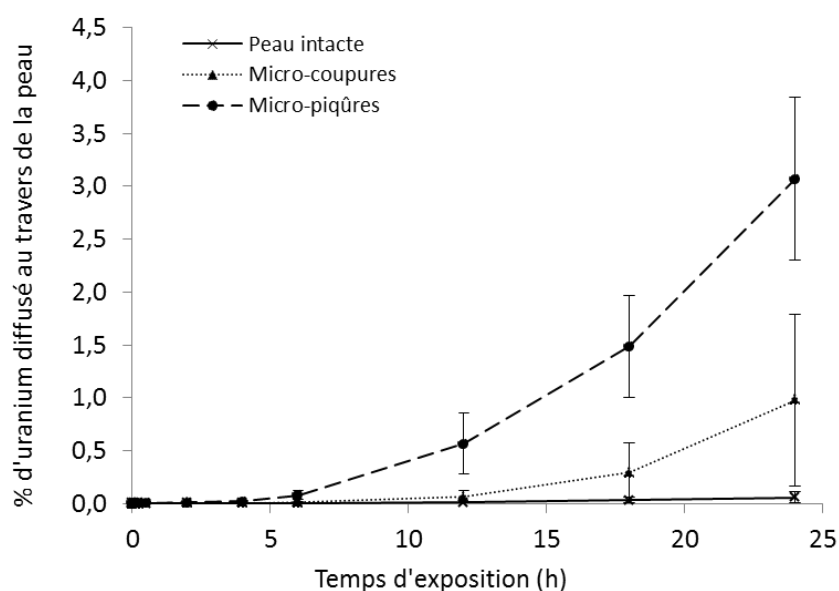


Figure 25 : Cinétique de diffusion percutanée de l'uranium en cellules de Franz, en fonction de l'intégrité des explants de peau, après contamination par 600 μL de nitrate d'uranyle à 10 mg.L^{-1} , $n = 6$.

1.2. Etudes de l'efficacité de décontamination *in vivo*

Dans ce contexte, un protocole d'étude, validé par un comité d'éthique, a été mis en place. Les principaux paramètres expérimentaux adoptés seront discutés dans les paragraphes suivants.

Afin d'être comparable aux études menées dans la littérature sur les expérimentations *in vivo* de contaminations par l'uranium (De Rey *et al.* 1983, Fukuda *et al.* 2009, Petitot *et al.* 2007a,b; Zhu *et al.* 2009), le **choix du modèle animal** c'est porté sur le rat. De plus, celui-ci constitue un modèle de petite taille, facile à manipuler, et moins coûteux que des animaux de plus grande taille. Nous avons travaillé plus particulièrement avec le rat Sprague Dawley, qui est une espèce non consanguine de rats albinos, facile à élever. La mutation « Hairless » de l'animal, c'est-à-dire « sans poil » aurait également pu être intéressante afin de limiter à la fois le nombre de manipulations de l'animal nécessaire pour sa tonte et sa dépilation, mais également afin de réduire le nombre de follicules pileux très importants chez l'espèce non mutée. L'inconvénient pour l'étude du passage transcutané de l'uranium avec une espèce « Hairless » est l'épaississement de l'épiderme de l'animal. Dans notre cas, le choix final a été imposé par la disponibilité des espèces des centres d'élevages.

Après avoir tondu, dépilé et lésé les rats selon leur groupe d'appartenance, ces derniers ont été contaminés par une solution de **nitrate d'uranyle à 40 mg.L⁻¹**. Les raisons du choix de la forme physico-chimique de la contamination restent identiques à celles énoncées précédemment dans le cadre des études *ex vivo*. La concentration a quant à elle était augmentée en raison de la répartition de l'uranium dans l'organisme de l'animal. En effet, d'après les résultats d'une étude préliminaire (données non présentées), le dépôt cutané d'une solution de contamination de concentration plus faible ne permettait pas, après prélèvement des principaux organes de rétention, d'observer une différence entre les rats contaminés et les témoins non contaminés, dont l'uranium détecté correspondait à l'uranium naturellement présent dans les différents organes. L'augmentation de cette concentration, ainsi que la limite des volumes pouvant être déposés sur la surface cutanée délimitée par la pause d'un anneau en téflon, nous ont contraints à diminuer le ratio molaire calixarène / uranium, passant de 81 pour les études *ex vivo* à 40 pour les études *in vivo*. Le calixarène n'est alors plus en large excès par rapport aux ions uranyle, ce qui explique la difficulté d'observer l'efficacité propre à sa chélation lorsque celui-ci est présent dans la nanoémulsion.

Contrairement aux études *ex vivo* pour lesquelles le **temps de contamination** était de 24 h, cette durée a dû être étendue à 48 h chez l'animal. Cela nous a permis notamment d'avoir la totalité du pic urinaire de l'uranium, dont en moyenne 50 % est excrété par cette voie environ 24 h après contamination cutanée (Leggett & Pellmar 2003).

Durant toute la durée d'expérimentation, la solution de contamination et le traitement appliqué immédiatement après ont été maintenus en **conditions occlusives**, tout comme pour les études *ex vivo*

précédemment décrites. Bien que cela s'éloigne des conditions réelles de décontamination, qui auraient nécessité un rinçage bien avant les 48 h d'exposition, ce choix expérimental était nécessaire pour nous permettre de visualiser l'éventuel passage de l'uranium dans les urines et les organes et ainsi comparer l'effet des différents traitements, sans quoi la limite de détection de l'appareil de quantification n'aurait pas été suffisante. Comme cela a été évoqué auparavant, une augmentation de la concentration en uranium de la solution de contamination n'était pas envisageable en raison du ratio molaire calixarène / uranium alors trop faible, ce dernier ne pouvant être compensé par augmentation du volume du traitement en raison du volume total de dépôt limité. Par ailleurs, le caractère occlusif était inévitable lors de ces études, puisqu'il constituait le seul procédé permettant de maintenir en place la contamination durant toute l'expérimentation après réveil de l'animal. De plus, tout comme pour les études *ex vivo*, ces conditions sont alors favorables au passage de l'uranium, et donc idéales pour l'évaluation de l'efficacité de notre nanoémulsion.

Au cours de l'expérimentation, ainsi qu'au terme des 48 h d'exposition, plusieurs **prélèvements** ont été réalisés :

- Un rinçage à l'eau ultrapure de la zone cutanée contaminée a été effectué, puis analysé afin d'en quantifier la teneur en uranium. Cette quantité reflète alors la quantité d'uranium non diffusée au travers de la peau, et par comparaison entre les différents groupes, l'efficacité de chaque traitement à limiter cette diffusion.
- Le logement individuel des animaux en cage à métabolisme a permis la récupération des urines excrétée à 24 et 48 h.
- Après euthanasie des animaux, la zone cutanée initialement contaminée a été prélevée. Afin de quantifier la rétention de l'uranium dans ses principaux organes de rétention que sont les reins et le squelette, un rein et un fémur de chaque animal ont également été prélevés.

Ainsi la quantité d'uranium présente à la fois dans les urines, mais également dans les reins et fémurs des animaux, reflète la quantité d'uranium qui a diffusé au travers de la peau. En effet, si la teneur en uranium diminue dans les urines et les organes de rétention, cela signifie qu'une quantité moins importante d'uranium a diffusé au travers de la peau, et donc que l'efficacité de décontamination du traitement appliqué est plus importante. Cela complète alors les informations données par le dosage des eaux de rinçage, qui reflète la quantité non diffusée dans la peau. La teneur cutanée de l'uranium est également importante, puisqu'en présence de couche cornée, la peau peut agir comme un réservoir de l'uranium (Petitot *et al.* 2004, Spagnul *et al.* 2011), retardant alors sa biodistribution.

Suite aux résultats expérimentaux obtenus *ex vivo*, un choix a été fait quant à la valorisation des études menées *in vivo*, vis-à-vis des traitements témoins présentés, mais également quant aux lésions

superficielles étudiées. En effet, suite à des contraintes de fermeture définitive en 2013 de l'animalerie du site de Pierrelatte, toutes les expérimentations *in vivo* ont dues être menées sur un temps très court ne permettant que très peu de recul. En raison des réglementations spécifiques relatives à l'autorisation de détention et de manipulation de certains radio-isotopes, à la contamination radiologique en expérimentation animale, et enfin, au retraitement des déchets contaminés engendrés, seul ce centre animalier pouvait accueillir des expérimentations au cours desquelles des animaux étaient contaminés par de l'uranium. Ajouté à cela un planning de réservation très chargé causé par cette fermeture, ces études *in vivo* ont dues être menées en grande partie avant les études *ex vivo*.

De ce fait, le choix initial des **traitements témoins** était le suivant : i) visualisation de l'effet de la dilution de la contamination par traitement à l'eau ultrapure ; ii) traitement par de la nanoémulsion non chargée afin d'évaluer l'effet propre du véhicule ; iii) traitement par de l'eau savonneuse en utilisant du savon liquide Trait rouge® additionné d'eau, utilisé en tant que décontaminant cutané dans l'industrie nucléaire en France.

Lors de l'analyse ultérieure des échantillons prélevés, nous avons constaté une variabilité importante des résultats pour les animaux contaminés et traités par de l'eau ultrapure (données non illustrées), formant alors plusieurs populations. Afin d'expliquer ce phénomène, la première hypothèse émise fut la variabilité du pH de l'eau ultrapure utilisée. En effet, celui-ci s'est avéré fluctuer d'une session d'expérimentation à une autre, atteignant parfois des pH supérieurs à 7. La solution de contamination étant tamponnée à pH 5, cette hypothèse a par la suite été écartée, puisque le pH théorique du mélange « solution de contamination + eau » ne varie pas dans ces conditions expérimentales. Après application de la solution de contamination et du traitement sur le dos des animaux, ce mélange est laissé tel quel durant toute la durée de l'expérimentation, soit 48 h. Bien que les conditions soient occlusives, une évaporation se produit au cours du temps, concentrant alors la solution de contamination de départ. D'après les courbes de spéciation de l'uranium dans les conditions initiales (Figure 26a), et à la suite d'une concentration de celui-ci (Figure 26 (b) UO_2^{2+} concentré 10 fois, (c) UO_2^{2+} concentré 20 fois et (d) UO_2^{2+} concentré 40 fois), il apparaîtrait une précipitation d'hydroxyde d'uranium. Celle-ci surviendrait à des pH d'autant plus acides que la concentration en ions uranyle est importante, tout en restant dans une zone de pH supérieure au pH de travail (pH = 5). De plus, au contact de l'air, l'eau peut se charger en carbonate au cours du temps. Dans ce cas de figure, et d'après les courbes de spéciation de l'uranium présentées dans la figure 27 il apparaîtrait que l'augmentation à la fois de la concentration en uranium et de la concentration en carbonate dans le milieu provoquerait la formation d'un composé cristallisé ($\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{c})$). Ce phénomène se produirait à des pH d'autant plus faibles que la concentration en carbonate augmenterait (à pH = 5,66 pour $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 27b), et à pH = 4,96 pour $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (Figure 27c), cela pour une même concentration d'uranium (solution concentrée 10 fois par rapport à la concentration initiale). Bien que les

calculs de spéciation restent un modèle qui peut ne pas prendre en compte certaines interactions entre les espèces, cela pourrait constituer une piste expliquant la variabilité des résultats obtenus pour l'ensemble des animaux ayant reçu l'eau ultrapure en tant que traitement. Dans ce contexte, il n'était donc pas envisageable d'interpréter de tels résultats. C'est pourquoi nous nous sommes par la suite concentrés principalement sur les témoins « eau savonneuse » et « nanoémulsion non chargée » pour les études *in vivo*, et avons remplacé l'eau ultrapure par du tampon acétate dans les études *ex vivo* menées ultérieurement en cellules de Franz.

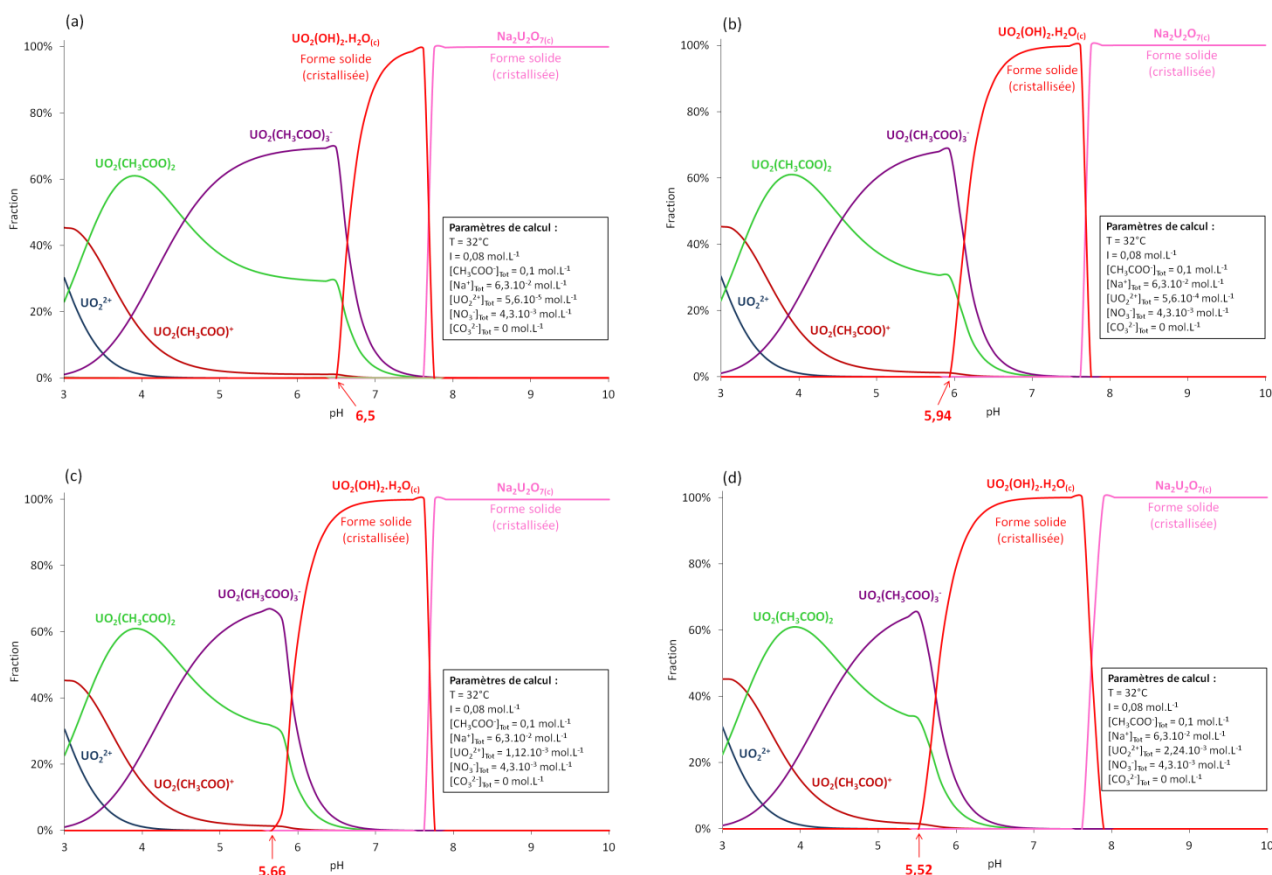


Figure 26 : Effet de la variation de la concentration de l'ion uranyle sur sa spéciation en milieu tampon acétate dans les conditions expérimentales *in vivo*, avec (a) $[U(VI)] = 5,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; (b) $[U(VI)] = 5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$; (c) $[U(VI)] = 1,12 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ et (d) $[U(VI)] = 2,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (logiciel MEDUSA)

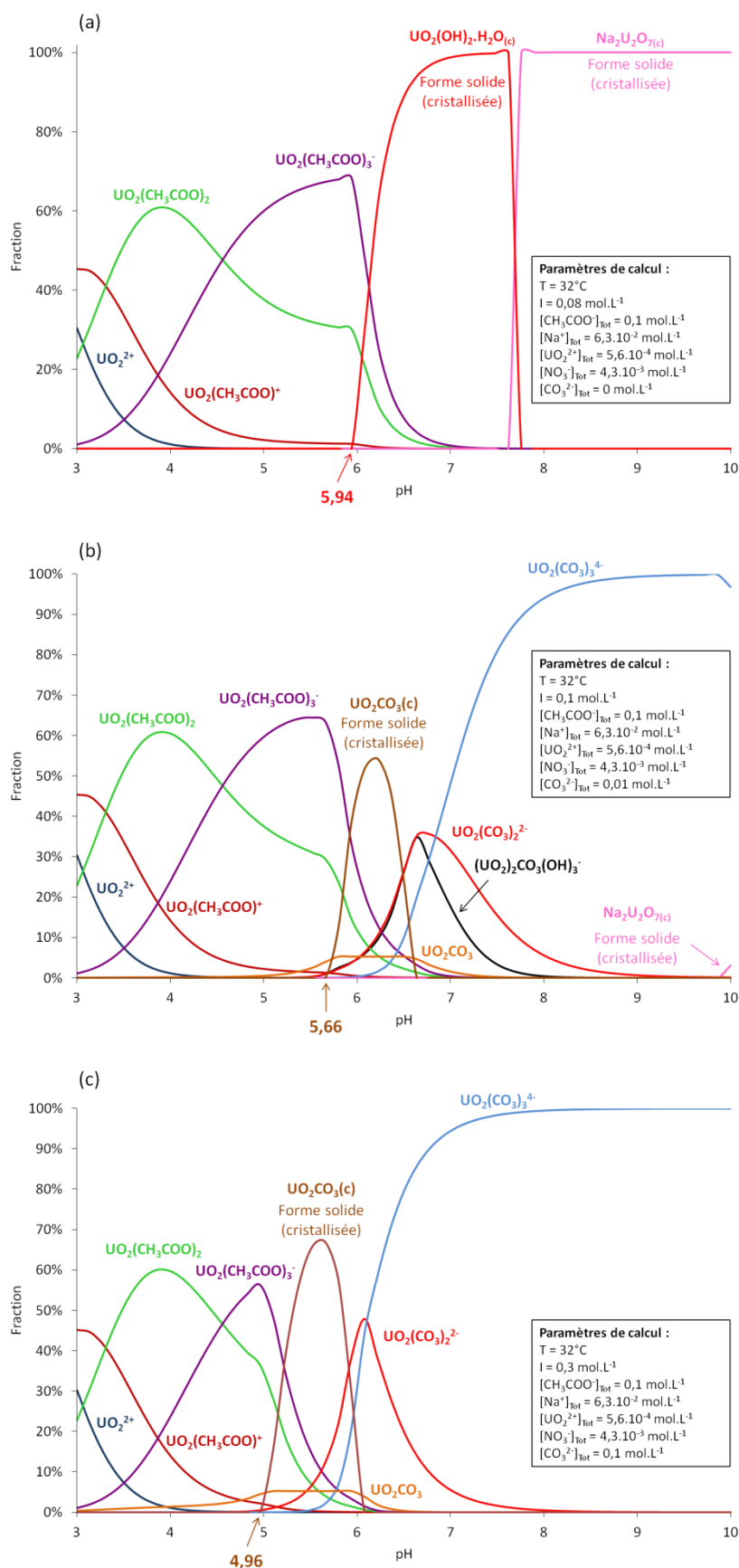


Figure 27 : Effet de la variation de la concentration en carbonate sur la spéciation de l'ion uranyle en milieu tampon acétate dans les conditions expérimentales *in vivo* concentrée 10 fois avec $[\text{U(VI)}] = 5,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et (a) $[\text{CO}_3^{2-}] = 0 \text{ mol.L}^{-1}$; (b) $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ et (c) $[\text{CO}_3^{2-}] = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ (logiciel MEDUSA)

De plus, les études *in vivo* présentées dans la partie 2 de ce chapitre ne considèrent que deux types de **lésions superficielles contaminées** : l'excoriation et la micro-piqûre. La **figure 28** présente quant à elle les résultats *in vivo* obtenus après contamination et traitement d'animaux présentant des lésions par microcoupures. En raison de l'absence des échantillons d'explants de peau des animaux traités par de l'eau savonneuse pour des raisons techniques, et l'impossibilité de reconduire ces expérimentations, ces résultats n'ont pas été intégrés dans la publication scientifique présentée ci-avant. Cependant, comme cela a pu être présagé au vu des expérimentations *ex vivo*, qui montrent de faibles passages de l'uranium au travers de la peau lorsque celle-ci est lésée par micro-piqûres ou microcoupures en raison de la présence de la couche cornée, les résultats obtenus *in vivo* après contamination de peaux lésées par microcoupures sont similaires à ceux obtenus après micro-piqûres.

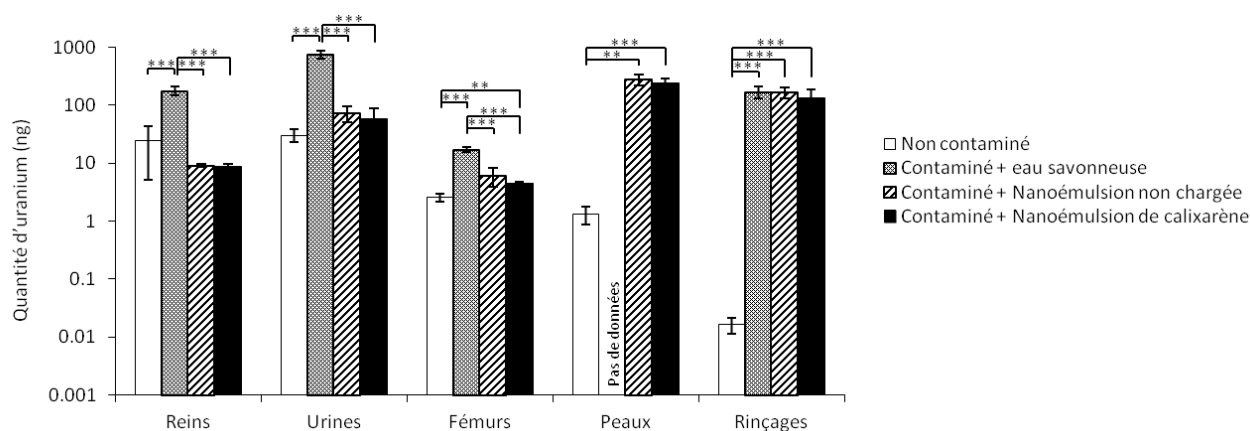


Figure 28 : Quantité d'uranium (ng) détectée dans les différents échantillons prélevés, en fonction du traitement appliqué immédiatement après contamination cutanée par du nitrate d'uranyle de rats présentant des microcoupures.

***, **, *** = différences statistiquement significatives avec $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$ (Test t de Student).**

Afin de s'affranchir de l'effet matrice des échantillons lors du dosage de l'uranium par ICP-MS des différents organes préalablement minéralisés, la méthode d'étalonnage par **dilution isotopique** a été utilisée. En effet, l'ICP-MS est une technique de spectrométrie de masse permettant une analyse atomique de l'échantillon qui nécessite un étalonnage. Celui-ci peut être externe, et consiste alors en l'utilisation d'une gamme d'étalonnage, qui est une méthode facile et rapide à mettre en œuvre, tout à fait adaptée pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, cette méthode se voit limitée par les effets matrices parfois difficiles à reconstituer, entraînant alors un biais dans le résultat d'analyse. Les minéralisats de nos organes constituant des matrices complexes, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'étalonnage par dilution isotopique. Pour cela, à une quantité connue de l'échantillon est ajoutée une quantité connue d'uranium (traceur), dont la composition isotopique est différente de celle de l'échantillon. Le rapport isotopique du mélange est alors mesuré (**Annexe 1**). Nos échantillons, qui contiennent essentiellement de l'uranium appauvri, mais aussi de l'uranium naturel, présentent donc

essentiellement les isotopes suivants de l'uranium : ^{234}U , ^{235}U et ^{238}U . Aussi le choix du traceur s'est porté sur une solution contenant un mélange des isotopes ^{233}U et ^{236}U , dont la composition isotopique est certifiée.

Enfin, en complément des dosages par ICP-MS de la concentration en uranium dans les différents organes prélevés, des études menées par la technique de **microscopie SIMS** (Secondary Ion Mass Spectrometry) ont permis la localisation de l'uranium accumulé au niveau cutané, après sélection d'échantillons issus des expérimentations *in vivo*. Pour cela, ces échantillons ont été préalablement inclus en résine, permettant la réalisation de coupes très fines. L'analyse élémentaire et isotopique de ces surfaces solides a ainsi pu être réalisée par un faisceau d'ions couplé à un spectromètre de masse. Le principe de cette technique repose sur le bombardement de la surface de l'échantillon à analyser par un faisceau d'ions primaires (O_2^+ , O^- , Cs^+ , Ar^+). L'échantillon est alors pulvérisé, et une partie de la matière pulvérisée est ionisée, émettant ainsi des particules superficielles (atomes ou molécules) dans un état chargé ou non. Ces « ions secondaires », représentatifs de la composition élémentaire et isotopique du secteur analysé bombardé, vont alors être accélérés vers un spectromètre de masse qui permettra de mesurer la composition isotopique de la surface de l'échantillon selon le rapport masse sur charge. Les ions décollés de chaque point de la surface bombardée sont alors concentrés dans une image par une lentille d'objectif d'immersion. Ainsi, il a été choisi d'analyser des échantillons de peaux d'animaux provenant des groupes suivants :

- Animaux lésés par excoriation, contaminés puis traités par de l'eau savonneuse
- Animaux lésés par micro-aiguilles, contaminés puis traités par de l'eau savonneuse
- Animaux lésés par micro-aiguilles, contaminés puis traités par de l'eau ultrapure

Les résultats obtenus pour les deux premiers groupes ont été présentés au cours de la partie 2 de ce chapitre, et montrent une rétention de l'uranium principalement au niveau de la couche cornée et des follicules pileux, avec une quantité plus faible d'uranium à la surface d'une peau excoriée en comparaison à une peau lésée par micro-piqûre. En revanche, les résultats concernant les animaux traités par de l'eau ultrapure n'ont pas été discutés dans cette précédente partie. L'analyse SIMS d'une peau issue d'un animal lésé par micro-piqûres, contaminé, puis traité par de l'eau ultrapure ([Figure 29](#)) confirme encore une fois l'accumulation de l'uranium au niveau de la couche cornée de la peau, agissant comme réservoir. Les quantités détectées au niveau de la surface cutanée sont relativement faibles, ce qui peut expliquer qu'aucune trace d'uranium ne soit détectée plus en profondeur par l'appareil, puisqu'il est possible que nous nous situons en deçà de sa limite de détection. Pour ces mêmes raisons, l'analyse présentée ici ne permet pas de statuer sur la présence ou non de précipités d'uranium qu'aurait pu provoquer l'ajout d'eau ultrapure. De plus, le nombre d'échantillon analysé n'est pas suffisant pour permettre de conclure à ce sujet, d'autant qu'en cas de précipités, leur visualisation aurait nécessité une analyse sur un nombre très important de coupes, puisqu'il est fortement probable que leur répartition ne soit pas homogène.

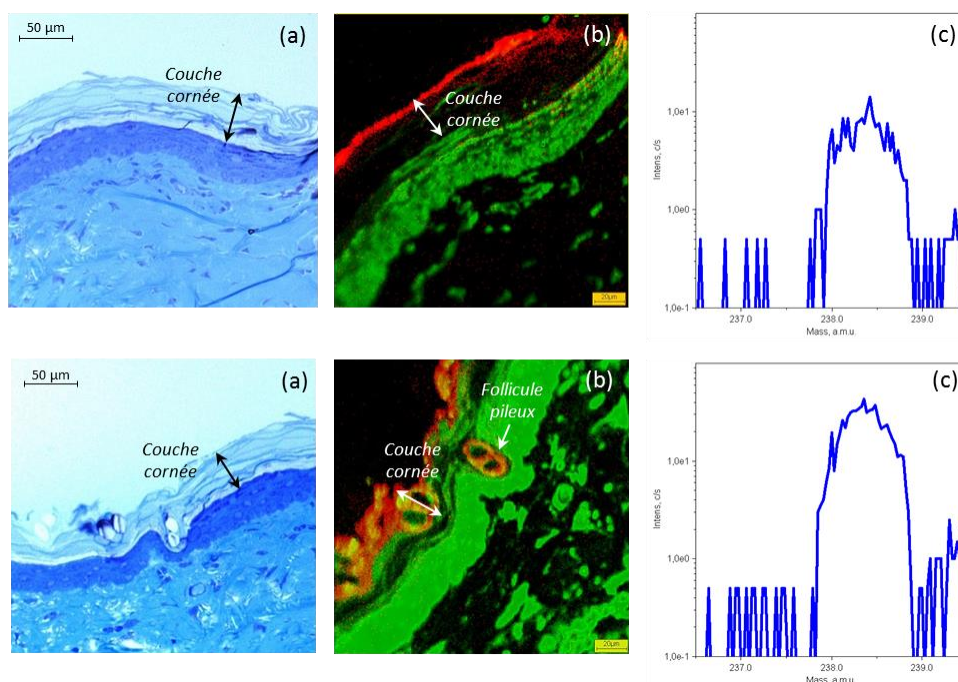


Figure 29 : Couches supérieures d'une peau de rat contaminé par du nitrate d'uranyle, traité immédiatement par de l'eau ultrapure; (a) : Images histologiques; (b) superposition des images SIMS $^{238}\text{U}^+$ (rouge) et $^{40}\text{Ca}^+$ (vert) ; (c) spectre de masse entourant la masse 238 de l'uranium

1.3. Etudes de la toxicité *in vitro* de la nanoémulsion de calixarène

La nanoémulsion de calixarène étant destinée à une application locale au niveau de la zone contaminée, il était important d'étudier sa toxicité cutanée. Pour cela, des études préliminaires de toxicité *in vitro* ont été réalisées à l'aide du test MTS, sur une lignée de fibroblastes murins (cellules constituant le derme, assurant sa cohésion et sa souplesse) : les NIH3T3 (Annexe 2). D'après les résultats obtenus, présentés dans la figure 30, aucune différence de viabilité cellulaire n'est observée entre des cellules mises en présence de la nanoémulsion non chargée, préalablement diluée dans du DMEM (milieu de culture), ou de la nanoémulsion de calixarène également diluée. Ces premiers résultats tendent à montrer que le calixarène incorporé dans la nanoémulsion ne parait pas avoir d'effet sur la viabilité des cellules. Cependant, cette viabilité diminue lors de l'augmentation de la concentration en nanoémulsion, qui peut être expliquée par le choc osmotique des cellules en présence d'une trop forte quantité en eau, dont la nanoémulsion est principalement constituée.

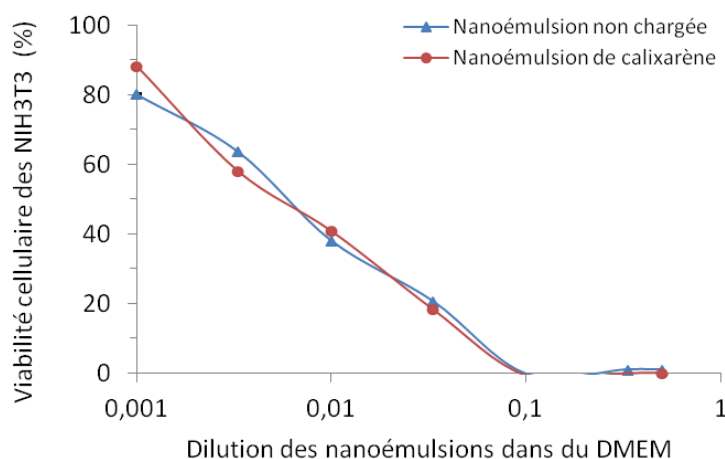


Figure 30 : Viabilité d'une lignée cellulaire de NIH3T3 en fonction de la quantité de nanoémulsions mises en contact

Afin d'approfondir ces études de toxicité, nous avons choisi de travailler en culture tissulaire, sur des modèles d'épidermes humains reconstitués (RHE). Ces derniers se composent de kératinocytes humains, cultivés sur un filtre en polycarbonate inerte à l'interface air-liquide, dans un milieu chimiquement défini. Ce modèle est plus adapté à l'étude de l'évaluation de la toxicité cutanée de notre nanoémulsion, puisqu'il est histologiquement similaire à de l'épiderme humain *in vivo* (Annexe 3), et permet d'étudier l'effet cutané de produits non dilués. Les paragraphes suivants s'attacheront à détailler les choix des conditions expérimentales.

Trois **traitements témoins** ont été appliqués sur les modèles RHE :

- Du PBS (Phosphate Buffered Saline) en tant que témoin négatif, puisqu'il respecte l'intégrité de la peau ;
- Une solution de SDS (Sodium DodecylSulfate) à 5 % en tant que témoin positif, qui est un détergent et tensioactif ionique fort ;
- Et enfin la nanoémulsion non chargée, pure, permettant d'étudier la toxicité du véhicule. Cela permet également de vérifier par comparaison l'absence de toxicité cutanée du calixarène incorporé dans la nanoémulsion d'intérêt.

Trois conditions expérimentales ont été étudiées en faisant varier les temps de contact et de post-incubation (notés par la suite sous la forme x / y). Dans un premier temps, les conditions expérimentales validées par l'ECVAM, de 42 min / 42 h ont été réalisées (protocole OECD 42'), et ont permis de conclure à une non toxicité à la fois de la nanoémulsion en tant que véhicule, mais également de la nanoémulsion de calixarène. Des temps intermédiaires de 2 h / 42 h ont permis d'arriver aux mêmes conclusions que précédemment. Enfin, nous avons choisi de laisser les produits en contact avec les RHE pendant 24 h, afin de pouvoir par la suite corréler les résultats obtenus avec les études *ex vivo* précédemment menées, durant lesquelles les traitements sont laissés en contact avec les explants de peau 24 h également. Comme cela a

été démontré dans la partie 1 de ce chapitre, d'après ces études *in vitro*, la nanoémulsion de calixarène n'entraîne pas de toxicité cutanée, ce même après un temps de contact prolongé de 24 h.

2. Intérêt de la nanoémulsion de calixarène

Dans cette seconde partie, l'intérêt de l'utilisation de la nanoémulsion de calixarène en tant que traitement de décontamination cutanée sera discuté, autant d'un point de vue pratique, que d'un point de vue scientifique.

Comme cela a déjà été évoqué, aucun traitement spécifique et efficace de première intention en cas de contamination cutanée à l'uranium n'est à l'heure actuelle disponible. En l'absence de tel dispositif, l'application en urgence de la nanoémulsion de calixarène pourrait permettre une meilleure prise en charge des victimes, plus rapide, notamment en cas de blessures contaminées par l'uranium, et ce même lorsque celles-ci semblent bénignes. En plus de rassurer ces victimes, cela pourrait également permettre d'alléger les traitements de décontamination administrés après leur transfert au service médical.

De plus, la forme fluide et principalement aqueuse de la nanoémulsion est aisément éliminable par simple rinçage, combinant ainsi cette action de décontamination par dilution à celle du piégeage spécifique de l'uranium par les propriétés chélatantes du calixarène incorporé. L'intérêt de cette formule réside également dans les excipients qui la composent (tensioactifs non ioniques, huile de paraffine et eau), puisque ces derniers ont été choisis pour leur bonne tolérance et faible pouvoir pénétrant (Martini 2006, Spagnul 2009). De plus, la présence de gouttelettes de taille nanométrique (environ 150 nm de diamètre) dans le système développé permet une plus grande surface de contact entre la phase huileuse et la phase aqueuse, où se situent les molécules de calixarène ainsi disponibles pour la chélation des ions uranyle présents dans une phase aqueuse externe.

La position à l'interface de ces molécules de calixarène au sein de la nanoémulsion permet la chélation des ions uranyle. Cependant, il n'est pas impossible que la disposition de celles-ci ne soit pas systématiquement perpendiculaire à la surface des gouttelettes huileuses dispersées. Selon les études de modélisation moléculaire (Boulet *et al.* 2006, 2008), cela ne constituerait pas un obstacle à l'efficacité de chélation, puisque celle-ci peut avoir lieu avec seulement deux des trois fonctions carboxyliques du calixarène et une molécule d'eau.

D'après l'ensemble des études expérimentales menées sur la nanoémulsion de calixarène, il a été démontré qu'elle constituerait un traitement de décontamination efficace, moins agressif que l'emploi de l'eau savonneuse actuellement employée. Contrairement à notre nanoémulsion, l'utilisation d'un système constitué de membranes liquides émulsionnées à base de calixarène, comme cela a déjà été développé (Ramkumar *et al.* 2002), permet de renouveler la disponibilité du calixarène. En effet, ce système permet

aux ions uranyle d'être dans un premier temps complexés par les molécules de calixarène se situant à la surface de la phase membranaire. Le complexe ainsi formé atteint ensuite la phase interne où il se dissociera, concentrant les ions uranyle à l'intérieur de cette phase et permettant aux molécules de calixarène d'être à nouveau disponible pour la chélation au niveau de la phase externe. Cependant, un relargage des ions uranyle peut survenir en cas de déstabilisation du système. Dans le cas de notre nanoémulsion, bien que les molécules de calixarène formant le complexe calixarène / uranium ne soient alors plus disponibles à la chélation, un véritable piégeage spécifique des ions uranyle est réalisé.

• • •

Conclusions & Perspectives

• • •

Les conclusions principales de l'ensemble de ces travaux de thèse sont les suivantes :

- Quel que soit le modèle de lésions cutanées superficielles étudié (excoriation, microcoupures, micro-piqûres), l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène a été démontrée sur un modèle *ex vivo*, en comparaison à :
 - une simple dilution par de l'eau,
 - un traitement par de l'eau savonneuse,
 - une application de la nanoémulsion non chargée.
- Le système émulsionné que constitue la nanoémulsion présente une efficacité de décontamination *in vivo* chez le rat plus importante que le traitement par de l'eau savonneuse. Le gain d'efficacité dû à l'apport spécifique du calixarène dans la formulation n'a cependant pu être démontré lors de ces expérimentations.
- Suite aux études menées sur des modèles *ex vivo* et *in vivo*, l'application de l'eau savonneuse en tant que décontaminant paraît favoriser le passage de l'uranium au travers de la peau, notamment lorsque celle-ci ne présente plus de couche cornée.
- Enfin, la nanoémulsion de calixarène n'induit pas de toxicité cutanée, même après un temps de contact de 24 h sur des épidermes humains reconstitués.

A l'issue de ces travaux, la nanoémulsion de calixarène paraît constituer un système prometteur, adapté aux traitements d'urgences des contaminations cutanées par l'uranium, qui pourrait être utilisé comme solution de rinçage.

Afin d'approfondir ces résultats, plusieurs axes de recherche seraient envisageables, comme l'étude *in vivo* de l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène chez un animal plus imposant tel que le mini-porc, ou bien le développement de nouveaux dispositifs de contamination et d'application des traitements chez le rongeur qui offriraient de plus grandes surfaces de contact avec la peau. Cela permettrait d'avoir une surface de contamination plus importante, et ainsi d'augmenter le ratio molaire calixarène / uranium afin que celui-ci soit comparable aux études *ex vivo*. Il serait également intéressant d'approfondir les études d'efficacité par retrait de la contamination avant l'application du traitement, et éventuellement d'évaluer l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène après applications répétées. Cela permettrait de se rapprocher d'avantage de l'utilisation réelle qui pourrait être envisagée.

Il serait également intéressant d'optimiser la formulation galénique de cette nanoémulsion de calixarène. Bien qu'une forme shampooing et une forme thermo-gélifiante aient déjà été développées, une forme de type filmogel, plus adaptée au traitement de peaux présentant des lésions plus ou moins sévères, pourrait être réalisée.

Dans cette perspective, une étude d'efficacité de décontamination menée sur des peaux contaminées et lésées par brûlures chimiques ou thermiques pourrait également être initiée. De telles lésions pouvant impliquer un passage du calixarène dans la voie systémique, une étude approfondie de sa biodistribution et de sa toxicité serait également souhaitable.

La molécule de calixarène utilisée dans le cadre de ces études présente une forte affinité non seulement pour l'uranium, mais aussi pour d'autres actinides tels que le plutonium et l'américium. Il pourrait donc être envisagé d'étendre le domaine d'action de la nanoémulsion de calixarène à ces actinides. En effet, l'étude de son efficacité de décontamination suite à une contamination cutanée par le plutonium, l'américium, ou encore un mélange de ces deux derniers, éventuellement combiné à l'uranium, pourrait être entreprise. De même, il serait intéressant d'évaluer l'action de cette nanoémulsion après contaminations cutanées faisant intervenir d'autres formes physico-chimiques (solides, poudres), ou d'autres composés plus ou moins solubles et transférables (UO_2 , UO_3 ou U_3O_8 pour l'uranium par exemple), comme cela peut survenir lors d'accident dans l'industrie du nucléaire.

Enfin, il pourrait être envisageable à plus long terme de développer un système permettant l'utilisation de ce calixarène en tant que décorporant de l'uranium. La biodistribution de ce système après injection ainsi que sa toxicité devront alors être étudiées.

Références – Discussion générale

- Baglan N, Cossonnet C, Tromprier F, Ritt J, Bérard P. 1999. Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys.* 77(4):455–61
- Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW, F. Eckerman K, W. Townsend L. 2003. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosim.* 105(1-4):509–12
- Bérard P, Michel X, Menetrier F, Laroche P, Bérard P. 2010. Medical management of a cutaneous contamination. *Health Phys.* 99(4):572–76
- Bhattacharyya MH, Breitenstein BD, Métivier H, Muggenburg BA, Stradling GN, Volf V. 1995. *Traitement de La Contamination Interne Accidentelle Des Travailleurs. Publication IPSN.112*
- Boulet B, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Cote G. 2006. Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extr. Ion Exch.* 24(3):319–30
- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. 2008. Theoretical study of the uranyl complexation by hydroxamic and carboxylic acid groups. *Inorg. Chem.* 47(18):7983–91
- Bouvier-Capely C, Manoury A, Legrand A, Bonthonneau JP, Cuenot F, Rebière F. 2009. The use of calix[6]arene molecules for actinides analysis in urine and drinking water: An alternative to current procedures. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 282(2):611–15
- De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. 1983. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environ. Res.* 30(2):480–91
- Dinse C, Baglan N, Cossonnet C, Bouvier C. 2000. New purification protocol for actinide measurement in excreta based on calixarene chemistry. *Appl. Radiat. Isot.* 53(1-2):381–86
- Dinse C, Cossonnet C, Baglan N, Asfari Z, Vicens J. 1997. Extraction sélective des actinides : application à l'analyse radiotoxicologique. *Radioprotection.* 32(5):659–71
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. 2009. Acute toxicity of subcutaneously administered depleted uranium and the effects of CBMIDA in the simulated wounds of rats. *Health Phys.* 96(4):483–92
- Golda N, Koo J, Maibach H. 2005. Effects and uses of occlusion on human skin: An overview. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 24(2), 91-104.
- Grappin L, Bérard P, Menetrier F, Carbone L, Courtay C, *et al.* 2007a. Treatment of actinide exposures: A review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 127(1-4):435–39
- Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, Carbone L, Courtay C, *et al.* 2007b. Exposure to actinides : report on Ca-DTPA injections in CEA-AREVA centres. *Radioprotection.* 2007, 42:163–96
- Houpert P, Muller D, Chazel V, Claraz M, Paquet F. 2003. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 105(1-4):517–20
- IAEA. 1996. *Assessment and Treatment of External and Internal Radionuclide Contamination.* IAEA-TECDO
- IAEA E. 2005. Generic procedures for medical response during a nuclear or radiological emergency. *EPR-MEDICAL, Vienna: IAEA-WHO*

- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, *et al.* 2007. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. *Ski. Res. Technol.* 13(1):19–24
- Leggett RW, Pellmar TC. 2003. The biokinetics of uranium migrating from embedded DU fragments. *J. Environ. Radioact.* 64(2-3):205–25
- Makki S, Muret P, Sai'd AM, Bassignot P, Humbert P, *et al.* 1996. Percutaneous absorption of three psoralens commonly used in therapy: Effect of skin occlusion (in vitro study). *Int. J. Pharm.* 133(1-2):245–52
- Martini M-C. 2006. *Introduction À La Dermopharmacie et À La Cosmétologie*. Ed. Lavoisier (2^{ème} édition).
- Muller D, Houpert P. 2006. Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux: le DTPA et l'uranium. *Radioprotection.* 41(4):413–20
- OECD/OCDE-428. 2004. Absorption cutanée : méthode in vitro. *Lignes directrices l'OCDE pour les essais Prod. Chim.*
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, *et al.* 2007a. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Heal. Phys.* 92(5):464–74
- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. 2007b. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat Prot Dosim.* 127(1-4):125–30
- Petitot F, Moreels AM, Paquet F. 2004. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 82(2):133–39
- Ramkumar J, Nayak SK, Maiti B. 2002. Transport of uranyl ion across a bulk liquid membrane using calixarene and synergistic agents as carriers. *J. Memb. Sci.* 196(2):203–10
- Seiller M, Martini MC. 1996. *Formes Pharmaceutiques Pour Application Locale*. Technique & Documentation-Lavoisier.
- Spagnul A. 2009. *Développement d'une forme pharmaceutique véhiculant un calixarène destinée au traitement d'une peau saine ou lésée contaminée par de l'uranium*. Université Paris-Sud 11
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Adam M, Phan G, Rebière F, Fattal E. 2010. Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion. *Int. J. Pharm.* 398(1-2):179–84
- Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Landon G, Tessier C, *et al.* 2011. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79(2):258–67
- Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D, Tymen, P. Gerasimo, D. Hoffschir H. 2000. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol.* 76(10):1417–24
- Zatz J. 1993. Skin permeation: fundamentals and application. Allured Pub Corp.
- Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S. 2009. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Arch. Toxicol.* 83(1):37–46

Annexes

Annexe 1 : Dosage par dilution isotopique de la quantité d'uranium dans les échantillons issus des expérimentations *in vivo*

Principe

A une quantité connue de l'échantillon est ajoutée une quantité connue d'uranium (traceur), dont la composition isotopique est différente à celle de l'échantillon, puis le rapport isotopique du mélange est mesuré.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, le traceur utilisé contient principalement de l' ^{233}U et ^{236}U (tableau 1). Les échantillons contiennent quant à eux de l'uranium appauvri (U_{app}) dont l'isotopie est détaillée dans le tableau 2.

Tableau 1 : Composition isotopique du traceur utilisé

% atomique				
^{233}U	^{234}U	^{235}U	^{236}U	^{238}U
50,46	0,02	0,00	49,51	0,01

Tableau 2 : Composition isotopique de l'uranium appauvri

% atomique		
^{234}U	^{235}U	^{238}U
0,0013	0,3	99,6987

Informations nécessaires au calcul des concentrations

V_T	Volume du traceur (mL)
V_E	Volume de l'échantillon (mL)
T_{236}	% atomique de ^{236}U contenu dans le traceur (donnée de référence)
M_E	Masse molaire de U_{app}
M_T	Masse molaire du traceur
C_T	Somme des concentrations de chaque isotope dans le traceur ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
C	Biais en masse
$(236/238)_M$	Rapport 236/238 mesuré dans l'échantillon
E_{238}	% ^{238}U sur U total dans échantillon

Calculs

Calcul de la masse molaire de U_{app} (ma = masse atomique, données de référence) = M_E

$$M_E = (\% ^{234}U \times ^{234}Uma + \% ^{235}U \times ^{235}Uma + \% ^{238}U \times ^{238}Uma) / 100$$

Calcul de la masse molaire du traceur = M_T

$$M_T = (\% ^{233}U \times ^{233}Uma + \% ^{234}U \times ^{234}Uma + \% ^{235}U \times ^{235}Uma + \% ^{236}U \times ^{236}Uma + \% ^{238}U \times ^{238}Uma) / 100$$

Calculs intermédiaires pour le calcul de C_t

(1) Masse de ^{236}U dans le traceur (μg) = Activité (Bq) / Activité spécifique ($Bq \cdot \mu g^{-1}$)

(2) Concentration de ^{236}U dans le traceur ($\mu g \cdot L^{-1}$) = Masse de ^{236}U (1) x Volume (L)

(3) Concentration par isotope dans le traceur ($\mu g \cdot L^{-1}$) = Rapport massique x Concentration de ^{236}U (2)

$$C_T = \text{somme des concentrations par isotope (3)}$$

Calcul du biais en masse = C

$$C = \frac{R_{ref} - R_{mesuré}}{R_{ref} \times \Delta m}$$

R_{ref} = rapport certifié des deux isotopes ^{233}U et ^{236}U de l'étalon

R_{mes} = rapport mesuré des deux isotopes ^{233}U et ^{236}U de l'étalon

Δm = différence de masse entre ^{233}U et ^{236}U

Calcul du rapport $^{236}U/^{238}U$ mesuré dans le mélange échantillon / traceur = $(236/238)_m$

$$(236/238)_m = \frac{R_{mesuré}}{1 - C \times \Delta m}$$

$R_{mesuré}$ = Rapport mesuré des deux isotopes ^{236}U et ^{238}U

C = biais en masse calculé précédemment

Δm = différence de masse entre ^{236}U et ^{238}U

% ^{238}U sur U total dans échantillon, corrigé = E_{238}

$$E_{238} = \frac{1}{\sum \text{Rapports corrigés (=Rcor)}}$$

$$R_{cor} = \frac{R_{mesuré}}{1 - C \times \Delta m}$$

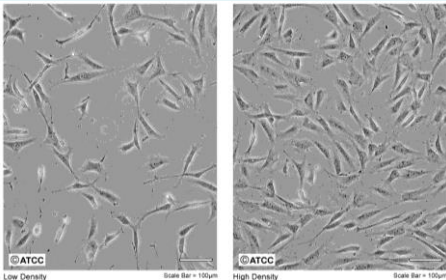
Dans notre cas, $\sum R_{cor} = (234/238)_{cor} + (235/236)_{cor} + (238/238)_{cor}$

Calcul de la concentration dans l'échantillon : C_E

$$C_E = C_T \times \frac{V_T}{V_E} \times \frac{M_E}{M_T} \times \frac{T_{236}}{E_{238}} \times \frac{1}{\left(\frac{236}{238}\right)_m}$$

Annexe 2 : Etudes préliminaires de la toxicité *in vitro* de la nanoémulsion de calixarène par test MTS sur une lignée cellulaire de NIH3T3

Lignée cellulaire (source : ATCC)

Designations	NIH/3T3
Growth Properties:	Adherent
Organism	<i>Mus musculus</i> fibroblast
Morphology	
Source	Organ: Embryo Strain: NIH/Swiss Cell Type: Fibroblast
Age	Embryo
Propagation	<p>ATCC complete growth medium: The base medium for this cell line is ATCC-formulated Dulbecco's Modified Eagle's Medium. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: bovine calf serum to a final concentration of 10%.</p> <p>Atmosphere: air, 95%; carbon dioxide (CO₂), 5%</p> <p>Temperature: 37.0°C</p> <p>Growth Conditions: The serum used is important in culturing this line. Calf serum is recommended and not fetal bovine serum. The calf serum initially employed and found to be satisfactory was from the Colorado Serum Co. Denver.</p>
Subculturing	<p>Protocol:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Remove and discard culture medium. 2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin - 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum which contains trypsin inhibitor. 3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes). Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal. 4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting. 5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels. 6. Incubate cultures at 37°C. <p>Subculture at least twice per week at 80% confluence or less.</p> <p>Subcultivation Ratio: Inoculate 3 to 5 X 10⁽³⁾ cells.cm⁻²</p> <p>Medium Renewal: Twice per week</p>
Preservation	<p>Freeze medium: Complete growth medium supplemented with 5% (v/v) DMSO</p> <p>Storage temperature: liquid nitrogen vapor phase</p>

CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, bulletin technique (source : Promega)

The CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay is a colorimetric method for determining the number of viable cells in proliferation or chemosensitivity assays. The CellTiter 96® AQueous Assay is composed of solutions of a novel tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) and an electron coupling reagent (phenazine methosulfate; PMS). MTS is bio-reduced by cells into a formazan product that is soluble in tissue culture medium. The absorbance of the formazan at 490 nm can be measured directly from 96-well assay plates without additional processing.

The conversion of MTS into aqueous, soluble formazan is accomplished by dehydrogenase enzymes found in metabolically active cells (Figure 1). The quantity of formazan product as measured by the amount of 490nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture (Figure 2).

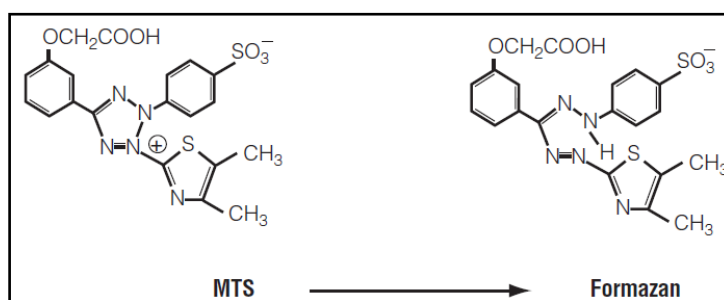


Figure 1: Structures of MTS tetrazolium and its formazan product

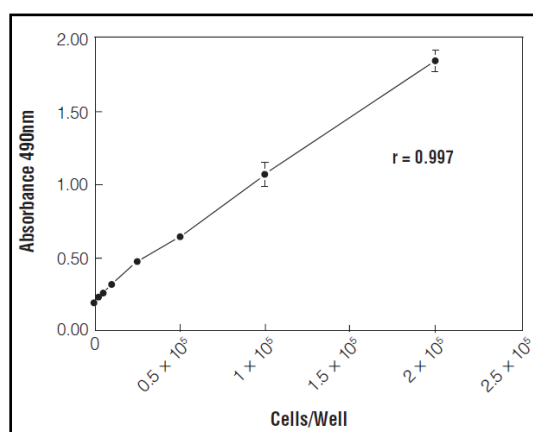
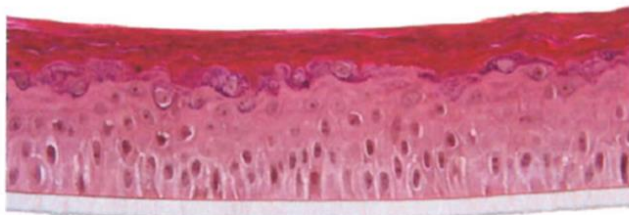


Figure 2: Effect of cell number on absorbance at 490nm measured using the CellTiter 96® AQueous Assay

Annexe 3 : Epiderme humain reconstitué (RHE)**SkinEthic****TECHNICAL DATA, SAFETY SHEET AND CERTIFICATE OF ANALYSIS
OF RECONSTRUCTED HUMAN EPIDERMIS**

CCE-093-RHE D17-S/00

CCE-093-RHE D17-S/00

Description:	Reconstructed Human Epidermis (RHE/S/17) 0.5 cm ² reconstructed epidermis of normal human keratinocytes. Cells are grown on inert polycarbonate filters in chemically defined medium, for 17 days.		
Usage:	FOR SCIENTIFIC USE ONLY - PRODUCT OF HUMAN ORIGIN		
Storage:	This product was prepared and packaged using aseptic techniques. Store in an incubator at 37°C, 5% CO ₂ with saturated humidity.		
Passage:	Second (strain n° PK2 NE07)		
Batch N°:	14-RHE-008		
Origin:	Foreskin		
Histology:	 <p>Control n° E140815</p>		
Quality Controls:	Test	Specification	Result
	Histological observation at day 17 (HES stained vertical paraffin sections, n=6)	Number of cell layers ≥ 4	5 cell layers
		Absence of significant histological abnormalities	Absence of significant histological abnormalities
		Well differentiated epidermis consisting of basal, spinous, granular layers and a stratum corneum	Satisfactory
	Cell viability at day 17 (570 nm optical density, MTT test, n=2)	O.D. > 0.7	O.D. = 1.304 \pm 0.102
	Barrier function integrity test (Exposure Time inducing 50% viability using Triton X-100 1%, n=12)	4.0h \leq ET50 \leq 10.0h	5.1 h
Biological safety:	On blood of the same donor, we have verified: <ul style="list-style-type: none"> . the absence of HIV1 and 2 antibodies . the absence of hepatitis C antibodies . the absence of hepatitis B antigen HBs On epidermal cells of the same donor, we have verified: <ul style="list-style-type: none"> . the absence of mycoplasma 		
Expiration date	September 15, 2014.		
"The use of this human tissue is strictly limited to in vitro testing. All other manipulations of this tissue such as: extraction and maintenance of single cells in culture, use of the tissue for diagnostic or therapeutic purposes and in human subjects, are strictly prohibited"			

Lyon, September 9, 2014.

Certified and released by

Julie BIDOGLIA, Quality Control Manager



Manufactured in accordance to the ISO9001 quality system of Episkin.

EPIKIN

CERTIFIED ISO 9001

 4, rue Alexander Fleming - 69366 Lyon Cedex 07 - France - Tél. (33) 04 37 28 22 00 - Fax. (33) 04 37 28 22 01
 au capital de 13 608 807 € - 412 127 565 R.C.S. Lyon - N° TVA intracommunautaire FR 46 412 127 565
 Email : sales@skinethic.com


Résumé

En cas de contamination cutanée radiologique par des composés d'uranium, les seuls traitements actuellement employés consistent en un rinçage de la zone contaminée par de l'eau et des détergents, ou par une solution de sel calcique de l'acide diéthylène-triamine-pentaacétique (Ca-DTPA). Ces derniers ne sont cependant pas efficaces vis-à-vis de l'uranium. De plus, en l'absence de traitement d'urgence, le passage transcutané de ce radionucléide est rapide, et induit une exposition interne après sa distribution dans l'organisme par le biais de la circulation sanguine. Une partie de l'uranium ainsi biodisponible est alors stockée dans les organes cibles que sont principalement les reins et le squelette, où ses effets toxiques se manifestent. C'est pourquoi une formulation topique consistant en une nanoémulsion huile dans eau, incorporant des molécules de calixarène tricarboxylique en tant qu'agent chélatant spécifique de l'uranium, a été initialement développée. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse visent à évaluer l'efficacité de décontamination *ex vivo* et *in vivo* de ce nouveau traitement d'urgence à la fois sur peaux intactes et sur peaux lésées superficiellement. Pour cela, le modèle d'excoriation a été utilisé. Des modèles de lésions reproductibles ont également été mis en place afin de mimer des incisions par micro-piqûres et microcoupures. Ces études démontrent que la nanoémulsion de calixarène pourrait constituer un traitement de décontamination efficace, moins agressif que l'emploi de l'eau savonneuse actuellement employée. Sa potentielle toxicité cutanée a également été évaluée *in vitro* par l'utilisation d'épiderme humain reconstitué, combinée à trois différents tests de toxicité (MTT, LDH et IL-1- α). Dans le cadre de ces études, il a ainsi été démontré que la nanoémulsion de calixarène n'induit pas de toxicité cutanée, même après un temps de contact prolongé jusqu'à 24 h.

Mots clés : Calixarène, nanoémulsion, décontamination, uranium, peau, lésion superficielle, toxicité

Abstract

In case of radiological skin contamination by uranium compounds, the only treatments currently available consist in rinsing the contaminated skin area with water and detergent, or with a calcium salt of diethylene triamine pentaacetic acid (Ca-DTPA) solution. However, these procedures are not specific and no efficient treatment for cutaneous contamination due to uranium exists. In the absence of such treatments, uranium diffusion through the skin is fast, inducing an internal exposure after its distribution inside the body through the bloodstream. One part of the bioavailable uranium is uptaken in target organs which are the kidneys and the skeleton, where its toxic effects occur. Therefore a topical formulation consisting of an oil-in-water nanoemulsion incorporating a tricarboxylic calixarene molecule, as a specific chelating agent for uranium, was previously developed. The work achieved in this thesis aimed at evaluating the *ex vivo* and *in vivo* decontamination efficiency of this new emergency treatment on intact and superficially wounded skin. For this purpose, skin excoriation model was used. Reproducible models of superficial wounds consisting of micro-cuts and micro-punctures were also developed in order to evaluate the efficiency of the nanoemulsion on physical wounds such as incisions. These studies showed that the calixarene nanoemulsion could be an efficient decontaminant treatment, less aggressive than using the current treatment: soaped water. Its potential cutaneous toxicity was evaluated on *in vitro* reconstructed human epidermis using three different toxicity tests (MTT, LDH and IL-1- α). These studies demonstrated that the calixarene nanoemulsion did not induce skin toxicity even after 24 h of exposure time.

Key words: Calixarene, nanoemulsion, decontamination, uranium, skin, superficial wound, toxicity